

Untersuchungen zur Biotransformation
von Tergurid:

Vergleich zwischen dem Modell der isoliert perfundierten
Rattenleber und dem Ganztierversuch an
Ratte, Hund und Affe

Karin Förster

Disbui. München

1987



Aus dem Hauptdepartment Pharmakokinetik
der Vorklinischen Entwicklung der SCHERING AG,
Berlin/Bergkamen
(Leiter: Dr. M. Hümpel)

Eingereicht über Prof. Dr. A. Petter
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz)

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOTRANSFORMATION

VON TERGURID:

VERGLEICH ZWISCHEN DEM MODELL DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN

RATTENLEBER UND DEM GANZTIERVERSUCH AN

RATTE, HUND UND AFFE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Karin Förster
aus München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. A. Petter
Korreferent:	Prof. Dr. R. Gothe

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
I EINLEITUNG	1
II LITERATURÜBERSICHT	5
1. Allgemeine Betrachtungen zur Biotrans- formation von Xenobiotica	5
2. Das Modell der isoliert perfundierten Leber - Allgemeines und seine Anwendung bei Biotransformationsstudien	11
3. Zur Biotransformation von Ergotalkaloiden	16
III METHODIK	30
1. <u>Perfusion der isolierten Rattenleber</u>	30
1.1 ^3H -Tergurid	30
1.2 Perfusionsapparatur	30
1.3 Versuchstiere	31
1.4 Operationstechnik	31
1.5 Zusammensetzung des Perfusionsmediums	33
1.6 Versuchsdurchführung	34
1.7 Analytik	35
1.7.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität	35
1.7.2 HPLC-Methode	35
2. <u>Metabolitenisolierung und -identifizierung</u>	37
2.1 <u>HPLC - High Performance Liquid Chromato-</u> graphy	37
2.1.1 Prinzip der Methode	37
2.1.2 Präparative HPLC	39
2.1.2.1 Kurze Übersicht über den Verlauf der Metabolitenisolierung aus dem Perfusat- gemisch	39
2.1.2.2 Phase I (16 mm-Säule)	40
2.1.2.3 Phase II (8 mm-Säule)	41
2.1.2.4 Phase III (4.6 mm-Säule)	44
2.1.3 Analytische HPLC	45

		SEITE
2.2	<u>Massenspektrometrie</u>	46
2.2.1	Prinzip der Methode	46
2.2.2	Durchführung	48
2.3	<u>Kernresonanzspektroskopie</u>	51
2.3.1	Prinzip der Methode	51
2.3.2	Durchführung	52
3.	<u>Studien am Ganztier</u>	54
3.1	Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung	54
3.1.1	Ratte	54
3.1.2	Hund	54
3.1.3	Affe	54
3.2	Versuchsdurchführung	55
3.2.1	Studien an der Ratte	55
3.2.2	Studien am Hund	55
3.2.3	Studien am Affen	56
3.2.4	Allgemeines Schema der in vivo Versuche	56
3.3	Analytik	57
3.3.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	57
3.3.2	HPLC-Methode	58
4.	<u>Geräte und Reagentien</u>	59
5.	<u>Auswertung</u>	60
5.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	60
5.2	Auswertung der HPL-Chromatogramme	61
5.3	Statistische Auswertung	61
5.4	Auswertung der Massenspektren und NMR-Spektren	61
IV	ERGEBNISSE	62
1.	<u>Perfusion der isolierten Rattenleber</u>	62
1.1	Bilanzierung der eingesetzten Dosis	62
1.2	Metabolitenmuster im Perfusat	63

2.	<u>Metabolitenisolierung und -identifizierung</u>	63
2.1	Isolierung und Reinigung der Metaboliten	63
2.2	Identifizierung der Metaboliten	70
2.3	Zuordnung der Metaboliten zum Metabolitenmuster	71
3.	<u>Studien am Ganztier</u>	74
3.1	Studien an der Ratte	74
3.1.1	Ergebnisse aus der Plasmaanalytik	74
3.1.1.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	74
3.1.1.2	Metabolitenmuster im Plasma	75
3.1.2	Ergebnisse aus der Urinanalytik	79
3.1.2.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	79
3.1.2.2	Metabolitenmuster im Urin	79
3.2	Studien am Hund	83
3.2.1	Ergebnisse aus der Plasmaanalytik	83
3.2.1.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	83
3.2.1.2	Metabolitenmuster im Plasma	83
3.2.2	Ergebnisse aus der Urinanalytik	89
3.2.2.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	89
3.2.2.2	Metabolitenmuster im Urin	89
3.3	Studien am Affen	90
3.3.1	Ergebnisse aus der Plasmaanalytik	90
3.3.1.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	90
3.3.1.2	Metabolitenmuster im Plasma	90
3.3.2	Ergebnisse aus der Urinanalytik	97
3.3.2.1	Bestimmung der Gesamtradioaktivität	97
3.3.2.2	Metabolitenmuster im Urin	97

V	DISKUSSION	99
1.	Perfusion der isolierten Rattenleber	99
2.	Metabolitenisolierung	101
3.	Wege der Biotransformation von Tergurid	102
4.	Studien am Ganztier	111
4.1	Pharmakokinetische Betrachtungen	111
4.2	Biotransformation	112

		SEITE
5.	Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber im Vergleich zum Ganz- tierversuch	115
6.	Wert der Studie und Ausblick	116
VI	ZUSAMMENFASSUNG, SUMMARY	118/120
VII	LITERATURVERZEICHNIS	122

I. EINLEITUNG

Die Wirkung der Mutterkornalkaloide ist der Menschheit schon seit dem Mittelalter bekannt. Der Genuß von Getreide und Getreideprodukten, die das Mutterkorn, *Secale cornutum*, ein mit dem Myzel des Pilzes *Claviceps purpurea* befallenes Getreidekorn in größeren Mengen enthielten, führte zu gefürchteten Vergiftungsepidemien, deren Symptome Durchblutungsstörungen mit daraus resultierenden Gangränen der Akren und Krämpfe (Ergotismus) waren. Bereits zu dieser Zeit wurde aber auch versucht, aus den pharmakologischen Eigenschaften des Mutterkornextraktes medizinischen Nutzen zu ziehen. Die stark kontrahierende Wirkung auf die Uterusmuskulatur führte zu seinem nicht ungefährlichen Einsatz bei der postpartalen Nachblutung und der Uterusatonie. Die schlechte Standardisierbarkeit des pulverisierten Extraktes führte häufig zum Tetanus uteri, der nicht selten tödlichen Ausgang nahm.

Seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts wurden aus dem Extrakt die verschiedenen Ergotalkaloide als Reinsubstanzen isoliert, ihre Struktur aufgeklärt und mit dem Ziel der Einengung ihres breitgefächerten Wirkspektrums - α -adrenolytischer Effekt, direkte Vasokonstriktion und Uteruskontraktion - modifiziert.

Erst zu Beginn der siebziger Jahre wurde die hohe Affinität bestimmter Ergotalkaloide zu Monoaminrezeptoren (Rezeptoren für Dopamin, Serotonin und Noradrenalin) im Gehirn erkannt.

Ein Jahrzehnt zuvor war als Ätiologie des Parkinson-Syndroms ein signifikanter Mangel an diesen Monoaminen, hier insbesondere an Dopamin, in den entsprechenden Unterstrukturen des Gehirns postuliert worden (Birkmayer u. Hornykiewicz, 1961). Der Einsatz von L-Dopa als Vorstufe des Dopamins und weiterführend von Dopaminagonisten erschien so als Mittel der Wahl bei der Therapie des Parkinson-Syndroms. Der Nachweis des



negativen Effekts von Dopamin auf die Freisetzung von Prolaktin aus dem Hypophysenvorderlappen (der prolactin inhibiting factor - PIF ist Dopamin) erschloß ein neues Indikationsgebiet für dopaminagonistische Aktivität entfaltende Arzneimittel (Del Pozo et al., 1972). Ergotalkaloide mit dopaminagonistischer Wirkung gehören daher zu einer Arzneimittelgruppe, in die momentan intensive Forschungsarbeit investiert wird.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Substanz Tergurid, das 9,10-Dihydro-Analog von Lisurid, einem Ergotalkaloid, das u.a. bereits erfolgreich als Prolaktinhemmer (Dopergin^R, Schering AG, Berlin) eingesetzt wird, befindet sich noch in der Phase der klinischen Prüfungen. Es ist wie Lisurid ein Derivat der iso-Lysergsäure, die selbst keine pharmakologischen Wirkungen entfalten soll. Tergurid besitzt ein vom Lisurid abweichendes pharmakologisches Profil. Im Tierexperiment wurden sowohl dopaminagonistische wie -antagonistische Wirkungen gefunden (Wachtel, 1983). Denkbare Einsatzgebiete sind folglich alle physiologischen und pathologischen Zustände, die eine Hemmung der Prolaktinausschüttung in der Hypophyse indiziert erscheinen lassen (Dallabonzana et al., 1985), und das Parkinson-Syndrom (Corsini et al., 1984).

Trotz der bis ins vorige Jahrhundert zurückreichenden pharmakologischen Anwendung der Ergotalkaloide war bis vor kurzem über die Biotransformation dieser Substanzen nur äußerst wenig bekannt (Eadie, 1983). Dies hatte seinen Grund vor allen Dingen darin, daß die meisten Lysergsäurederivate wegen ihrer hohen Wirksamkeit nur in so geringer Dosierung verabreicht werden konnten, daß sie in organischen Proben nicht mehr nachweisbar waren. Erst in jüngerer Zeit wurde mit dem

Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen und der Entwicklung hochempfindlicher Analysenmethoden (radio immuno assay - RIA, HPLC) das Studium der Metabolisierungsvorgänge ermöglicht (Maurer et al., 1982). Wollte man allerdings Abbauprodukte einer Substanz identifizieren, so mußten ausreichende Mengen an Metaboliten zur Verfügung stehen. Um das Problem der Toxizität der meisten Ergotalkaloide zu umgehen, wurde häufig auf in vitro Modelle, ganz besonders auf das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber zurückgegriffen (Toda u. Oshino, 1981; Siddik et al., 1979; Garattini et al., 1973). Hier kann der Hauptort der Biotransformation, die Leber, exklusiv betrachtet werden und es ist möglich, größere Substanzmengen einzusetzen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieses Modell für das Studium der Biotransformation von Tergurid genutzt. Neben den methodischen Vorarbeiten, wie z.B. der Erhöhung der Konzentration von Metaboliten in der biologischen Matrix, können durch diese Methode gegenüber dem Ganztierexperiment auch Versuchstiere in der pharmazeutischen Forschung eingespart werden. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die Übertragbarkeit der Ergebnisse der in vitro Studien auf die in vivo Verhältnisse abgeklärt ist.

Beide Grundfragen, die Versuchstiereinsparung durch die Nutzung des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber und die Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die in vivo Verhältnisse, sollten in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des synthetischen Ergotalkaloidderivates Tergurid bearbeitet werden.

Die Arbeit war eingebettet in ein größeres Forschungsprojekt der Schering AG, in dem zwei Biotransformationswege (N-Desalkylierung, Arylhydroxylierung) am Beispiel von zwei Standardsubstanzen (Bromergurid, Lonazolac) und zwei Prüfsubstanzen

(Lisurid, Tergurid) hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit in verschiedenen in vitro Systemen und im Ganztierversuch sowie in Humanstudien untersucht werden sollten.

Ziel dieses Projektes ist es, die Eignung von in vitro Modellen (primäre Zellkulturen, perfundierte Leber) für die genannten Umsetzungen hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Verhältnisse beim Menschen zu beschreiben. Dieses Forschungsprojekt ist wiederum Teil eines vom Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT) geförderten Verbundprojektes zur Erforschung von alternativen Methoden mit dem Ziel der Einsparung von Tierversuchen.

In der vorliegenden Arbeit sollten also Teilaspekte des o.g. BMFT-Projektes bearbeitet werden. Im einzelnen waren die folgenden Fragen zu beantworten:

- o Aufklärung der Strukturen von Metaboliten, die im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber entstehen
- o Versuch der Etablierung einzelner Biotransformationswege für Tergurid
- o Überprüfung der Übertragbarkeit des Metabolitenmusters aus der Rattenleberperfusion auf in vivo Verhältnisse
- o Vergleich der Metabolitenmuster der Testsubstanz Tergurid bei den Tierarten Ratte, Hund und Affe (*Macaca fascicularis*)

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeine Betrachtungen zur Biotransformation von Xenobiotica

Der Organismus nimmt im Laufe seines Lebens eine Vielzahl körperfremder, niedermolekularer Substanzen (Xenobiotica) auf. Umweltchemikalien, Farbstoffe und Konservierungsmittel aus der Nahrung und Arzneimittel gelangen auf oralem, inhalativem oder perkutanem Weg in den Körper. Die Verstoffwechslung dieser Verbindungen, ihre Biotransformation, ist ein wichtiger Prozeß bei ihrer Elimination aus dem biologischen System.

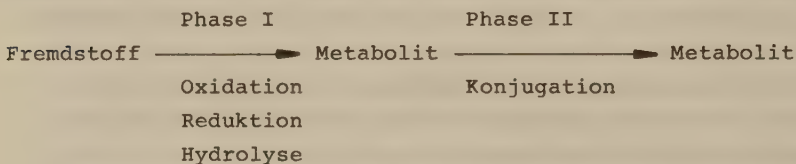
Im Laufe der Phylogenese, beim Übergang von Wasserlebewesen zu Landbewohnern, wurde das Wasser ein limitierender Faktor bei der Ausscheidung von Fremdstoffen. Während Fische die meisten Verbindungen durch Diffusion ans umgebende Medium abgeben können, sind Säuger darauf angewiesen, körperfremde Substanzen mit einem Minimalaufwand an Wasser ausscheiden zu können (Testa u. Jenner, 1976).

Viele Arzneimittel haben einen stark lipophilen Charakter, der es ihnen ermöglicht, über Penetration von biologischen Membranen an ihren eigentlichen Wirkort zu gelangen. Diese Eigenschaft ist aber auch Ursache für die nach Verteilung im Körper auftretende Anreicherung vieler Substanzen im Fettgewebe und bedingt des weiteren, daß bei unveränderter Ausscheidung der Ausgangsverbindung über Niere bzw. Galle, eine Rückresorption aus den Nierentubuli bzw. dem Darm und damit eine sekundäre Kumulation des Wirkstoffs nicht zu vermeiden wäre.

Hauptaufgabe des Körpers wird es also sein, Fremdstoffe in eine hydrophilere Form umzuwandeln und sie damit ausscheidbar zu machen.

Die Leber ist aufgrund ihrer Größe, ausgezeichneten Durchblutung und "strategischen Lage" (zit. n. Bonse u. Metzler, 1978) das Hauptmetabolisierungsorgan des Körpers. Biotransformationsprozesse finden aber auch in anderen Organen, wie Lunge, Haut, Niere, Darmepithel und Plazenta statt. Diese sind jedoch meist in geringerem Maße an der Umsetzung von Xenobiotica beteiligt, es sei denn, das Arzneimittel wird dem Körper über eben dieses Organ zugeführt (Applikation per inhalationem bzw. perkutan).

Zwei prinzipielle Reaktionsmechanismen stehen dem Organismus zur Verstoffwechslung von Xenobiotica zur Verfügung: strukturverändernde Reaktionen (Phase I-Reaktionen) und aufbauende Reaktionen (Phase II-Reaktionen).



(aus Bonse u. Metzler, 1978)

Konjugationsreaktionen setzen das Vorhandensein von kopplungsfähigen funktionellen Gruppen (Hydroxy-, Amino-, Sulfhydrylgruppen u.a.) voraus. Diese werden durch Phase I-Reaktionen in das Molekül eingeführt und stellen für sich schon einen ersten Schritt in Richtung Steigerung der Hydrophilie dar.

Phase I-Reaktionen sind nicht unbedingt Voraussetzung für Konjugationsreaktionen, es sind auch direkte Konjugationen der Ausgangsverbindung (z.B. Konjugation von 1-Naphthol, Berenbom u. Young, 1951) und Phase I-Reaktionen mit Konjugaten bekannt geworden (Testa u. Jenner, 1976).

Phase I-Reaktionen können in Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen eingeteilt werden.

Die Oxidation ist der vorherrschende Reaktionstyp bei Pharmaka (Jungermann u. Möhler, 1980). Die wichtigsten Oxidationsreaktionen sind Hydroxylierungen, N- und O-Desalkylierungen, Desaminierungen, N- und S-Oxidationen und Desulfurierungen. Diese Reaktionen werden durch bestimmte Enzyme katalysiert, die sich in verschiedene Klassen einteilen lassen: Oxidasen, die durch Entzug von Wasserstoff bzw. Elektronen oxidieren (z.B. die Alkoholdehydrogenase) und Oxygenasen, die eine Inkorporation von Sauerstoff in das zu oxidierende Substrat bewirken. Dioxygenasen, durch die beide Atome des Sauerstoffmoleküls in die Ausgangsverbindung eingebaut werden, spielen im Bakterienreich eine große Rolle. Die überragende Bedeutung für den Metabolismus von Pharmaka in der Säugerzelle haben die Monooxygenasen, von denen angenommen wird, daß sie alle Oxidationsreaktionen katalysieren können (Jungermann u. Möhler, 1980). Durch sie wird nur ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut, das andere wird zu Wasser reduziert. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie auch als mischfunktionelle Oxidasen (MFO) bezeichnet.

Die Monooxygenasen der Leberzelle sind an die Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums gebundene Enzymsysteme, in denen mehrere Komponenten zusammenwirken. Neben dem Cytochrom P-450 ist ein Flavinenzym, die NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase, erforderlich, das die Oxidation von NADPH katalysiert und die Reduktionsequivalente auf das Cytochrom überträgt. Außerdem ist die Reaktion an die Gegenwart bestimmter Phospholipide gebunden.

Die Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase findet sich bei der stufenweisen Zentrifugation von Leberzellhomogenat in der Mikrosomenfraktion, die Bruchstücke des glatten endoplasmatischen Retikulums und Ribosomen, zusammen Mikrosomen genannt, enthält.

Als weitere Bestandteile der Monooxygenasen sind die Hämoproteine Cytochrom P-448 und Cytochrom b_5 zu erwähnen.

Cytochrom P-450haltige Monooxygenasen zeichnen sich durch äußerst geringe Substratspezifität aus, d.h. es werden neben verschiedensten körperfremden Stoffen auch endogene Substrate, wie Steroide, Gallen- und Fettsäuren angegriffen (Forth et al., 1980). Neuerdings wird neben der geringen Substratspezifität auch die Multiplizität dieser Enzymsysteme als Erklärung für die Umsetzung strukturell so verschiedener Verbindungen herangezogen. Mindestens acht Formen sind allein aus der Rattenleber zu isolieren (Kitchin, 1984).

Aus diesen Eigenschaften heraus läßt sich erklären, daß diese Enzymsysteme im Sinne einer kompetitiven Hemmung leicht zu beeinflussen sind und auch große interindividuelle Schwankungen in der Enzymaktivität, z.B. aufgrund eines unterschiedlichen Fettsäureumsatzes, zu erwarten sind. Des weiteren sind verschiedene Stimulatoren der Neusynthese von Cytochrom P-450 bekannt. Als Prototyp gilt Phenobarbital, das häufig zur experimentellen Erzeugung einer Enzyminduktion beim Versuchstier verwendet wird. Ein hohes Maß an Lipophilie scheint hierbei die primäre Voraussetzung für die induktive Eigenschaft eines Substrats zu sein (Kitchin, 1984).

Reduktionsreaktionen werden vor allem durch die im Zytoplasma gelöste Oxidoreduktase Alkoholdehydrogenase katalysiert. Cytochrom P-450 und andere NADH oder NADPH abhängige mikrosomale Reduktasen sind ebenfalls an der reduktiven Umwandlung von Xenobiotica beteiligt. Eine wesentliche Rolle spielt hier aber auch die Reduktion von Fremdstoffen im Intestinaltrakt durch obligat anaerobe Keime (Pfeffer, 1986).

An hydrolysierenden Enzymen sind insbesondere unspezifische Esterasen und Amidasen an Biotransformationsreaktionen beteiligt. Neben im Blutplasma gelösten Esterasen sind auch mikrosomale und mitochondriale Enzyme dieses Typs bekannt. Epoxide, die als primäre Oxidationsprodukte aus aromatischen und aliphatischen Doppelbindungen entstehen, können z.B. durch Epoxidhydratasen in vicinale Diole umgewandelt werden.

Phase I-Reaktionen steigern die Hydrophilie einer Verbindung meist nur in geringem Maße. Die daran anschließenden Phase II-Reaktionen tragen dagegen wesentlich zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit einer Substanz und damit zu ihrer Ausscheidbarkeit bei.

Sehr häufig werden Konjugationsreaktionen mit aktivierter Glucuron- oder Schwefelsäure, die von Glucuronyl- bzw. Sulfo-transferasen katalysiert werden, angetroffen. Glucuronyltransferasen mit unterschiedlicher, jedoch meist geringer Substratspezifität sind wie die Monooxygenasen im Membransystem des glatten endoplasmatischen Retikulums der Leberparenchymzelle lokalisiert, wo sie aus Phase I-Reaktionen hervorgegangene Fremstoffe, aber auch körpereigene Substrate wie Steroide und Gallensäuren sofort weiter metabolisieren. Wenn Glucuronide wegen ihres hohen Molekulargewichts bevorzugt über die Galle (Bonse u. Metzler, 1978) ausgeschieden werden, kann es im Darm zu einer hydrolytischen Spaltung durch Glucuronidasen kommen. Der freiwerdende Phase I-Metabolit bzw. die Ausgangssubstanz kann dann rückresorbiert werden (enterohepatischer Kreislauf).

Weitere Konjugationsreaktionen von untergeordneter Bedeutung sind Methylierung und Acetylierung, sowie die Konjugation von Phase I-Metaboliten mit Glycin oder Glutathion.

Alle Biotransformationsreaktionen von Xenobiotica werden durch Enzymsysteme katalysiert, die primär dazu dienen, endogene Substrate zu verstoffwechseln, z.B. Steroide zu hydroxylieren und Gallensäuren zu konjugieren (Jungermann u. Möhler, 1980). Diese Vorgänge dienen der Aufrechterhaltung des physiologischen Status des Organismus. Stichworte sind in diesem Zusammenhang das reibungslose Funktionieren von Regelkreisen und die Entgiftung des Körpers von Endprodukten des Katabolismus.

Der häufigste Fall im Arzneistoffmetabolismus ist die Umwandlung einer pharmakologisch aktiven in eine inaktive Verbindung, wie z.B. bei der Hydroxylierung von Barbituraten (Forth et al., 1980) oder der oxidativen N-Desalkylierung von LSD, wobei das Folgeprodukt nur noch 10 % der halluzinogenen Aktivität der Ausgangsverbindung aufweist (Niwaguchi et al., 1974). Es kommt aber auch die Transformation einer inaktiven bzw. wenig aktiven Substanz in eine aktive bzw. stärker aktive vor (Imipramin-Desmethylimipramin, Jungermann u. Möhler, 1980) oder der Metabolit besitzt die gleiche Aktivität wie die Ausgangsverbindung (Metergolin-Desmethylnetergolin, Martini et al., 1983).

Als typische Giftungsreaktion gilt die Umwandlung eines wenig toxischen Pharmakons in einen stärker toxischen Metaboliten (Phenacetin - p-Phenetidin, Jungermann u. Möhler, 1980). Häufig entstehen auf diesem Wege reaktive Metaboliten, die mit zellulären Makromolekülen kovalente Bindungen eingehen und so karzinogene Wirkungen entfalten können (Thurmann et al., 1979; Kitchin, 1984).

Das Studium der Biotransformation eines Arzneistoffes (Art und Geschwindigkeit der Metabolisierung) bei Labortieren und Mensch gibt häufig wertvolle Hinweise für die Synthese neuer Wirkstoffe und ist wesentliche Voraussetzung für eine realistische Risikoabschätzung für die Anwendung der Substanz am Menschen.

Zum einen ist es möglich, durch gezielte Einführung von Substituenten in das Molekül zu biologisch stabileren Arzneistoffen zu gelangen. Zum anderen können gezielt "Pro-drugs" synthetisiert werden, die unter Ausnutzung der Biotransformationsleistungen erst im Organismus in das pharmakologisch wirksame Agens umgewandelt werden.

Toxikologische Untersuchungen an mehreren Labortierspezies werden durchgeführt, um das Risiko von Nebenwirkungen bei der therapeutischen Anwendung am Menschen abschätzen zu können. Eine Übertragbarkeit der Verträglichkeitsstudien am Labortier erscheint am ehesten bei denjenigen Spezies gegeben, bei denen das pharmakokinetische Verhalten des Wirkstoffs und seine Biotransformationswege weitgehend mit den am Menschen gefundenen Verhältnissen übereinstimmen. Weiterhin muß selbstverständlich eine Ähnlichkeit der pharmakologischen Wirkungsweise zwischen Tiermodell und Mensch gegeben sein.

Die Komplexität von Biotransformationsreaktionen und ihre Überschneidung mit Reaktionen des Intermediärstoffwechsels (Thurmann et al., 1979) läßt eine Vereinfachung der Situation für Metabolisierungsstudien als äußerst wünschenswert erscheinen. Die isoliert perfundierte Leber bietet sich hier als ein Modell an, durch das die Untersuchung von Biotransformationsprozessen am Hauptort der Metabolisierung unter Ausschaltung des Restorganismus ermöglicht wird.

2. Das Modell der isoliert perfundierten Leber - Allgemeines und seine Anwendung bei Biotransformationsstudien

Die Technik der isolierten Leberperfusion ist über 100 Jahre alt. Der erste dokumentierte Versuch wird Claude Bernard zugeschrieben. Er verwendete 1855 mit Leitungswasser perfundierte Lebern zum Studium der Glycogenolyse. Weitere Leberperfusionen wurden im 19. Jahrhundert hauptsächlich mit Organen

von Hund und Katze (Vollblut als Perfusionsmedium) durchgeführt, da biochemische Analysenmethoden noch auf große Substanzmengen angewiesen waren (Thurman et al., 1979).

Die Technik der Perfusion der isolierten Rattenleber zum Studium der Harnstoffsynthese wurde erstmalig von Trowell 1942 beschrieben.

Die revolutionäre Arbeit von Miller et al., 1951, in der zum ersten Mal eine radioaktiv markierte Verbindung (^{14}C -Lysin) zur Erforschung des Proteinstoffwechsels der Leber eingesetzt wurde, wird noch heute von vielen Autoren, insbesondere was den Aufbau der Perfusionsapparatur anbelangt, zitiert (Schimassek, 1963; Mitzkat u. Meyer, 1973; Thurman et al., 1979).

Verbesserte biochemische Methoden ließen das Interesse an Perfusionstechniken zur Anwendung bei verschiedensten biochemischen, physiologischen und pharmakologischen Fragestellungen sprunghaft ansteigen. Der Einsatz der Leberperfusion auf so unterschiedlichen Gebieten bedingte die Entwicklung einer Vielzahl von Techniken.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode der isolierten Leberperfusion geht operationstechnisch wie folgt vor: das Tier (Ratte) wird narkotisiert, das Abdomen eröffnet, die Perfusion in situ nach Katheterisierung der Vena portae eingeleitet, zum Abfluß des Perfusats die Vena cava thoracis und zur Gewinnung der Galle der Gallengang katheterisiert, die Leber freipräpariert und in die Perfusionskammer gelegt (Miller, 1973).

Es wurden aber auch in situ Perfusionen, insbesondere bei großen Versuchstieren wie dem Hund, beschrieben (Kestens u. Lambotte, 1973).

Die Art des Perfusionsmediums war ebenfalls Gegenstand zahlreicher Publikationen. Viele Autoren verwenden mit Puffer verdünntes, heparinisiertes oder defibriniertes, homo- oder heterologes Vollblut (Miller et al., 1951; v. Bahr et al., 1970; Kestens u. Lambotte, 1973). Als Vorteile wurden die physiologische Natur des Perfusats und damit seine hohe Sauerstoffbindungskapazität genannt. Nachteilig sind seine schlechte Standardisierbarkeit im Hinblick auf Hormone und vasoaktive Substanzen und bestimmte Eigenschaften der Erythrozyten: ihr Eigenmetabolismus (Schmucker et al., 1975), ihre Neigung zur Aggregation und die Gefahr der Hämolyse (Thurman et al., 1979). Ein erheblicher Nachteil insbesondere bei der Rattenleberperfusion ist bei Verwendung von homologem Vollblut die große Zahl an erforderlichen Blutspendertieren (für eine Leberperfusion mit 100 ml Perfusat werden ca. 20 Tiere benötigt!).

Als Weiterentwicklung kamen semisynthetische Medien aus gewaschenen Erythrozyten in Pufferlösungen mit Albuminzusatz zum Einsatz (Schimassek, 1962; Guder et al., 1973). Die Nachteile, die sich aus dem Vorhandensein von Erythrozyten ergeben, sind mit denen beim Einsatz von Vollblut identisch. Als Vorteil kann der Ausschluß von humoralen Faktoren gewertet werden.

Wegen der störenden Eigenschaften der Erythrozyten im beschriebenen Modell verwenden viele Laboratorien heute vollsynthetische, hämoglobinfreie Perfusionsmedien aus isoosmotischen Elektrolytlösungen mit oder ohne Zusatz von Albumin. Zur ausreichenden Sauerstoffversorgung der Leber wird die Durchflußrate des Perfusats durch das Organ von der physiologischen Dimension von 1 - 1.5 ml/min x g Leber (Schimassek, 1963) auf 3 - 3.5 ml/min x g Leber (Sugano et al., 1978) erhöht. Meijer et al. (1981) halten den Zusatz von 1 - 4 % Albumin als physiologischen Arzneimittelträgerstoff zum Perfusionsmedium für ratsam, andere Autoren für überflüssig (Sies, 1978; Sugano et al., 1978) und wieder andere sogar

für schädlich (Schmucker et al, 1975). Hetzel et al. (1973) befürworten die Zugabe von Albumin bei der Untersuchung von stark lipophilen Verbindungen zur Erhöhung ihrer Löslichkeit.

Eine weitere Klassifikation der Perfusionssysteme ergibt sich aus dem Lauf des Perfusats. Man unterscheidet geschlossene (rezirkulierende) und offene (nicht-rezirkulierende) Systeme.

Im geschlossenen System, das als Grundform der Leberperfusion gelten darf und auch heute noch vielfach Anwendung findet (Miller et al., 1951; Schimassek, 1962; v. Bahr et al., 1970; Toda u. Oshino, 1981), gelangt das Perfusat nach Durchströmen der Leber in porto-cavaler Richtung in ein Vorratsgefäß, aus dem es - mit einem zwischengeschalteten Schritt der Sauerstoffanreicherung - wieder durch das Organ gepumpt wird. Der Vorteil dieses Systems liegt in der im Verhältnis zu offenen Systemen genaueren Imitation der natürlichen Kreislaufverhältnisse. Aus ökonomischer Sicht werden nur geringe Mengen (ca. 100 ml) an Perfusionsmedium und zu untersuchendem Wirkstoff benötigt (Thurman et al., 1979). Nachteilig ist die allmähliche Änderung der Zusammensetzung des Perfusats, resultierend aus einer Abnahme des Substrats und einer Akkumulation von endogenen Produkten oder Metaboliten, die die Leberfunktion beeinträchtigen können (Meijer et al., 1981).

In offenen Systemen, heute von vielen Autoren bevorzugt (Sies, 1978; Thurman et al., 1979), durchströmt das Perfusat (für eine Perfusionsdauer von 2 h werden über 2 l benötigt!) aus einem großen Vorratsgefäß die Leber und wird danach aufgefangen und z.T. sofort analysiert (Thurman et al., 1979). Vorteil dieses Systems ist die Möglichkeit, die Zusammensetzung des einströmenden Perfusats über den ganzen Zeitraum der Perfusion konstant halten zu können. Gleichgewichtszustände können studiert werden; jede Leber stellt sozusagen ihre

eigene Kontrolle dar und kann während einer Perfusion unter verschiedenen metabolischen Bedingungen überprüft werden (Sies, 1978). Andererseits sind enorme Mengen Perfusat und Wirkstoff bereitzustellen, permeable Zellbestandteile können ausgewaschen werden (Meijer et al., 1981) und sekundäre Reaktionen sind nicht zu erfassen. Zum Studium der Biotransformation eines Arzneimittels bietet sich das geschlossene System an. Kleine Änderungen im Metabolitenmuster können genau verfolgt werden, wie auch Sekundärprozesse am besten hier untersucht werden können (Sies, 1978).

Abschließend sollen noch einmal die wesentlichen Vorteile des Modells der isoliert perfundierten Leber herausgestellt werden, die zu seiner häufigen Anwendung bei Biotransformationsstudien von Xenobiotika geführt haben (v. Bahr et al., 1970; Bickel u. Minder, 1970; Oshino u. Chance, 1977; Siddik et al., 1979 a; Toda u. Oshino, 1981). Mit Hilfe dieses Modells ist es möglich, die Rolle der Leber an der gesamten Umformung einer Substanz ohne Beeinflussung durch weitere, ebenfalls metabolisch aktive Organsysteme zu studieren. Ein Vorteil gegenüber in vitro Präparationen wie Leberzellhomogenaten, Gewebeschnitten und Mikrosomenfraktionen, an denen sich meist nur Einzelschritte der Biotransformation nachvollziehen lassen, ist die intakte Organstruktur der isoliert perfundierten Leber, die Studien des Gesamtmetabolismus einer Verbindung auch unter gleichzeitigem Ablauf von Biosynthesen (Thurman et al., 1979) erlaubt. Des weiteren können bei diesem Modell sehr hohe Dosen des Wirkstoffs, die im in vivo Versuch wegen eventueller Nebenwirkungen nicht vertretbar wären, eingesetzt werden, und so den Nachweis einer Vielzahl von Metaboliten einschließlich intermediärer Formen ermöglichen (Garattini et al., 1973).

3. Zur Biotransformation von Ergotalkaloiden

Obwohl die toxische Wirkung von *Secale cornutum* schon im Mittelalter bekannt war und obwohl der pharmakodynamische Effekt von Mutterkornextrakten seit dieser Zeit zur Behandlung der Uterusatonie und - noch in unserem Jahrhundert - des akuten Migräneanfalls genutzt wurde, lagen bis vor kurzem die Wege der Biotransformation dieser Verbindungen völlig im Dunkeln. Die Ursache dafür ist in der äußerst hohen Toxizität und der damit verbundenen geringen therapeutischen Breite der Substanzen zu sehen. So bewirkt das synthetische Mutterkornderivat Lysergsäurediethylamid (LSD) in einer Dosierung von nur 0.0005 - 0.0015 mg/kg (Forth et al., 1980) eine Bewußtseinsstrübung. Plasmaspiegel dieser Stoffe bewegen sich im ng-Bereich. Pharmakokinetische Untersuchungen und umso mehr Biotransformationsstudien scheiterten an der zu geringen Empfindlichkeit analytischer Methoden (Eadie, 1983; Kanto, 1983). Besonders die nahezu vollständige Metabolisierung von Ergotalkaloiden (Siddik et al., 1979 a; Hümpel et al., 1981; Vicario et al., 1983) ließ die Menge an Einzelmetaboliten, die zur spektroskopischen Identifizierung bereitgestellt werden konnte, unter das erforderliche Maß sinken. Erst mit Einführung neuer, hochspezifischer Methoden (radioaktiv markierte Verbindungen - Radioimmunoassay - RIA, HPLC u.a.) wurde der Einstieg in dieses Gebiet möglich. Und doch stellt Barthel noch 1984 fest: "Über den Metabolismus von Dihydroergotamin ist im Detail noch nichts bekannt".

Untersuchungen zur Biotransformation von Ergotalkaloiden werden häufig an in vitro Modellen, insbesondere der isoliert perfundierten Rattenleber, durchgeführt (Siddik et al., 1979 a; Toda u. Oshino, 1980), um die starken Wirkungen auf das Zentralnervensystem ausschalten und höhere Dosen einsetzen zu können.

Im folgenden sollen einige Vertreter der Mutterkornalkaloide mit für diese Substanzklasse typischen Biotransformationsreaktionen vorgestellt werden.

Das bereits erwähnte LSD ist als starkes Halluzinogen bekannt. Es beschäftigt Forensik und Pharmakologie schon seit zwei Jahrzehnten, und dennoch ist über seine Metabolisierung bisher nur wenig bekannt. Erst in den letzten Jahren wurde eine beträchtliche Zahl von Ergebnissen aus Biotransformationsstudien zur Aufklärung der Abbauege des LSD veröffentlicht.

Das Grundgerüst des LSD und aller anderen Ergotalkaloide ist die Lysergsäure (s. Abbildung 1).

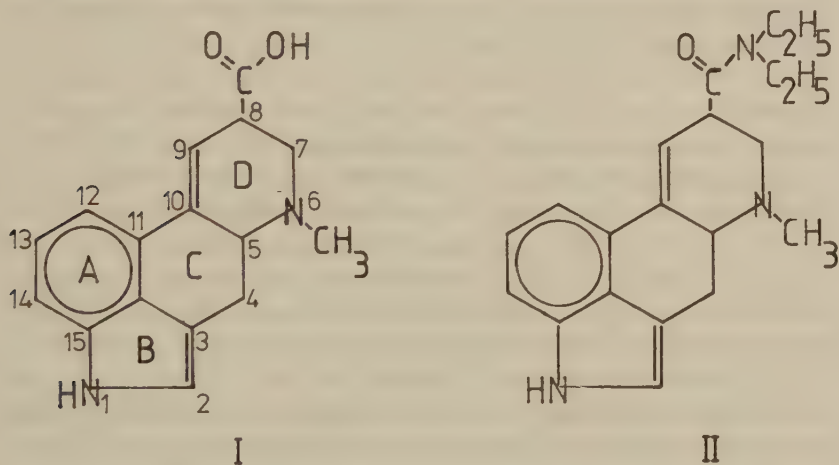


Abb. 1: Strukturformeln der Lysergsäure (I) und des LSD (II)

Für das LSD ergeben sich nach Inoue et al. (1980 a) die folgenden bevorzugten Angriffspunkte der Biotransformation: die Diethylamidgruppe, die N-Methylgruppe und das Indolringsystem. Erste Untersuchungen von Axelrod et al. an Mikrosomenpräparationen der Meerschweinchenleber ergaben bereits 1956 Hinweise auf ein Metabolisierungsprodukt, das 2-Oxo-LSD.

Siddik et al. beschäftigen sich seit 1975 (in vivo Versuche an der Ratte) mit der Biotransformation von LSD. Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber diente 1979 (a) zur Bereitstellung ausreichender Mengen an Metaboliten. 1 mg ^{14}C -LSD/g Leber wurde dem semisynthetischen Perfusionsmedium, das humane Erythrozyten als Sauerstoffträger enthielt, zugesetzt (rezirkulierendes System). Nach 4.5 h Perfusion enthielt die Galle 44.2 % der applizierten Radioaktivität, Perfusat und Leber 19.5 bzw. 19.7 %. Die Metaboliten wurden aus der Galle und einem Perfusat-Leber-Homogenat nach Vorreinigung über eine Amberlite XAD-2 Säule bzw. Extraktion mit Chloroform mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (TLC) isoliert und mit Hilfe von Infrarotspektroskopie (IR) Massenspektrometrie (MS) und ^1H -NMR-Spektroskopie (^1H -NMR) identifiziert.

LSD wurde nahezu vollständig metabolisiert und nur zu einem geringen Teil unverändert ausgeschieden. Für sechs von neun Metaboliten konnten Strukturvorschläge erbracht werden. Hauptmetabolit in der Galle war das Glucuronid von 14-Hydroxy-LSD mit mehr als 20 % der applizierten Radioaktivität. Das Glucuronid von 13-Hydroxy-LSD, 2-Oxo-LSD, ein im C-Ring aromatisiertes 2-Oxo-LSD, N_6 -Desmethyl-LSD und N' -Monodesethyl-LSD vertraten jeweils weniger als 10 % der Dosis.

Diese Strukturen wurden in einer Folgeveröffentlichung (Siddik et al., 1979 b) Metabolitenmustern aus in vivo Versuchen an Ratte, Meerschweinchen und Rhesusaffe zugeordnet. Die renale Elimination hatte bei den verschiedenen Spezies unterschiedlichen Stellenwert. Die Ratte schied nach intraperitonealer Applikation von 1 mg/kg ^{14}C -LSD in 96 h 16 % der applizierten Dosis im Urin aus, das Meerschweinchen nach gleicher Dosierung (i.p.) 28 % und der Rhesusaffe (0.15 mg/kg i.m.) 39 %. Auch

in diesen Versuchsansätzen wurde LSD nahezu vollständig metabolisiert und nur zu einem geringen Teil unverändert ausgeschieden. 13- und 14-Hydroxy-LSD und deren Glucuronide 2-Oxo-LSD, das im C-Ring aromatisierte 2-Oxo-LSD und N'-Monodesethyl-LSD konnten den Metabolitenmustern aus den Tierversuchen zugeordnet werden. Hinsichtlich der quantitativen Verteilung der Metaboliten und dem Verhältnis von strukturell aufgeklärten zu unbekannten Verbindungen bestanden große speziesspezifische Unterschiede. Während die Metabolitenmuster im Ratten- und Meerschweinchenurin trotz größerer Speziesunterschiede noch miteinander vergleichbar waren, war die Zahl der Biotransformationsprodukte von ^{14}C -LSD beim Rhesusaffen noch erheblich höher. Von wenigstens neun Metaboliten im Urin des Rhesusaffen konnten nur vier bekannten Strukturen zugeordnet werden. Die verbleibenden fünf nicht identifizierten Abbauprodukte repräsentierten 25.4 % der applizierten Dosis bzw. 75.9 % der mit dem Urin ausgeschiedenen Aktivität. Der Hauptmetabolit (11.3 % d. Dosis) konnte somit nicht identifiziert werden. Verschiedene Untersuchungen wiesen jedoch auf eine Substanz mit geöffnetem B-Ring hin.

Im Vergleich zwischen in vitro und in vivo Versuchen stellten die Autoren fest, daß die isoliert perfundierte Rattenleber bezüglich der Qualität der Metabolisierung ein geeignetes Modell zum Studium von Biotransformationsprozessen ist. Sowohl bei der Leberperfusion als auch in den in vivo Versuchen konnten dieselben Metaboliten nachgewiesen werden. Das Fehlen des N₆-Desmethyl-LSD im Ganztierversuch wurde nicht als Beweis für das Fehlen der oxidativen N-Desalkylierung am N-6 des Ringsystems in vivo gewertet. Es wurde vermutet, daß diese Struktur mit einer der nicht aufgeklärten Verbindungen identisch sei.

Zur Charakterisierung und Lokalisierung der Enzymsysteme, die an der Umsetzung von LSD beteiligt waren, wurden diverse Studien an Mikrosomenpräparationen von Leberhomogenat verschiedener Spezies durchgeführt (Niwaguchi et al., 1974; Inoue et al., 1980 a, b). Die oxidative N-Desalkylierung von LSD zu N₆-Desmethyl-LSD und N'-Monodesethyl-LSD wurde von NADPH und O₂ abhängigen mikrosomalen Enzymen katalysiert, die große Speziesunterschiede hinsichtlich ihrer Aktivität aufwiesen. Weitergehende Untersuchungen (Inoue et al., 1980 a) führten zur Isolierung des bereits bekannten 13-Hydroxy-LSD und zur Aufklärung einer neuen, quantitativ allerdings wenig relevanten Struktur, dem Lysergsäureethylvinylamid. Durch Studien mit verschiedenen Induktoren und Inhibitoren des mikrosomalen Monooxygenasesystems wurde festgestellt, daß, je nach Angriffspunkt, unterschiedliche Enzymsysteme an der Biotransformation beteiligt waren. Der LSD-Metabolismus dient so sekundär als Beispiel für die Multiplizität des Monooxygenasesystems der Leber.

Die Biotransformation der Ergopeptine, Strukturen, die in 8-Position des Lysergsäureringsystems einen zyklischen Peptidrest tragen, wurde ebenfalls erst in den letzten Jahren genauer untersucht. Maurer und Frick (1984) beschrieben die Biotransformation von Dihydroergotamin (DHE), einem halbsynthetischen Ergotalkaloid. Studien am Menschen nach einmaliger oraler Gabe von 3 mg ³H-DHE zeigten auf, daß auch diese Verbindung wie die meisten Ergopeptine (hohes Molekulargewicht!) zu einem Großteil in Form von Biotransformationsprodukten und nahezu exklusiv über die Galle ausgeschieden wurde. Weniger als 1 % der Dosis wurden in 72 h mit dem Urin eliminiert.

Zur Gewinnung ausreichender Mengen an Metaboliten dienten Mikrosomenpräparationen von Ratten- und Cynomolgenleber. Die auf diesem Wege erhaltenen Biotransformationsprodukte wurden

nach Extraktion mit Methylenchlorid über Dünnschichtchromatographie (TLC) und Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) isoliert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden (UV, $^1\text{H-NMR}$, MS) identifiziert. Zur Vergleichbarkeit mit den Abbauwegen beim Menschen wurden Versuche mit humanen Lebermikrosomen durchgeführt. Bevorzugter Angriffspunkt der Biotransformation war der Peptidanteil des Moleküls. Der Hauptmetabolit aus allen Versuchsansätzen war das 8'-Hydroxy-DHE, das aufgrund von Rezeptorbindungsstudien zusammen mit der Ausgangsverbindung als pharmakologisch aktives Prinzip von DHE postuliert wurde. Ein weiterer Weg der Biotransformation war die oxidative Hydrolyse der Amidbindung zwischen Lysergsäure- und Peptidanteil des Moleküls, die zur Bildung von Dihydrolysergsäure und dessen Amid führten. Nur ein geringer Teil des Wirkstoffs wurde durch oxidative Spaltung des Pyrrolrings metabolisiert.

Der Prozentsatz an identifizierten Metaboliten an der insgesamt eluierten Radioaktivität nahm im Plasma im Zeitverlauf deutlich ab. 71 % der Dosis konnten aus innerhalb von 2 h p.appl. gewonnenen Plasmaproben bekannten Strukturen zugeordnet werden. Zu einem späteren Zeitpunkt (24 - 60 h p.appl.) waren identifizierte Metaboliten nur noch zu 24 % vorhanden. Im 24 h-Urin bestanden 0.5 % bezüglich der insgesamt eliminierten 0.9 % der Dosis aus bekannten Abbauprodukten.

Maurer et al. (1982, 1983) widmeten sich intensiv der Biotransformation von Bromocryptin (BC), einem halbsynthetischen Ergopeptin mit einem C-2 substituierten Bromatom.

Ratten mit Gallenfistel, denen 4 Tage lang zweimal täglich je 15 mg/kg $^{14}\text{C-BC}$ über einen intraperitonealen Katheter appliziert wurden, und isolierte Rattenleberhepatozyten (Gesamteinsatz in 6 Experimenten 340 mg $^{14}\text{C-BC}$) wurden zur "Metabolitenproduktion" eingesetzt. Die Galle wurde nach vorheriger

Filtration über eine Amberlite XAD-2 Säule entsalzt. Die in ihr enthaltenen Metaboliten wurden mit Hilfe präparativer HPLC aufgetrennt. Die Biotransformationsprodukte aus den Hepatozyteninkubaten wurden mit Chloroform extrahiert, über präparative HPLC getrennt und erforderlichenfalls über TLC weiter aufgereinigt. Die isolierten Verbindungen wurden mit Hilfe spektroskopischer Methoden (UV, IR, ^1H -NMR, MS) strukturell aufgeklärt.

Mit diesen 16 identifizierten Metaboliten als Ausgangsbasis konnten 4 Hauptwege der Biotransformation von BC postuliert werden.

1. Die hydrolytische Spaltung der Amidbindung zwischen Lysergsäure- und Peptidanteil des Moleküls führte zur Bildung von 2-Bromo-Lysergsäure und deren Amid.
2. Die Epimerisierung am C-8 des Lysergsäureringsystems resultierte in der Bildung von entsprechenden 8α - Derivaten (z.B. 8α -BC und dessen Hydrolysaten).
3. Die regiospezifische Oxidation am C-8 des Prolinanteils ergab stereoisomere 8'-Hydroxy-BC-Derivate.
4. Durch weitere Oxidation der 8'-Hydroxy-BC-Derivate entstanden zum einen dihydroxylierte Verbindungen, die meist aus den entsprechenden Glucuroniden identifiziert werden konnten, und zum anderen Verbindungen mit geöffnetem Prolinring (Glutaminsäurederivate).

Inkubate mit isolierten Hepatozyten metabolisierten BC hauptsächlich zu apolaren Metaboliten (8'-Hydroxy-Derivate), während polare Verbindungen wie deren Glucuronide und die 2-Bromo-Lysergsäurederivate hauptsächlich von den Tieren mit Gallenfistel gewonnen werden konnten.

Aufgrund der beschriebenen Strukturen wurde der Peptidanteil des Moleküls als Hauptangriffspunkt der Biotransformation von BC vorgeschlagen. Diese Art des Abbaus steht im Gegensatz zur Metabolisierung von Ergolinen, bei denen primär der Lysergsäureanteil der Verbindung angegriffen wird.

In einer Folgestudie wurde die Biotransformation von radioaktiv markiertem BC (^3H bzw. ^{14}C) im in vivo (Maus, Ratte, Hund, Rhesusaffe, Mensch) und in vitro Experiment (isolierte Hepatozyten der Ratte und Mikrosomenpräparationen aus humanem Lebergewebe) untersucht (Maurer et al., 1983).

Die mittels analytischer HPLC erhaltenen Metabolitenmuster aus den biologischen Proben waren in allen Versuchsansätzen sehr vielfältig und ließen bei nahezu vollständigem Fehlen von unverändertem Wirkstoff im Urin auf eine äußerst intensive Verstoffwechslung von BC schließen.

Bei der Ratte waren alle Metaboliten aus der Galle und dem Urin mit Ausnahme der Glucuronide auch im Plasma wiederzufinden. 0.5 h nach intravenöser Applikation stellte BC neben der 2-Bromo-Lysergsäure den Hauptanteil an der Radioaktivität im Plasma, während der unveränderte Wirkstoff nach intragastral Applikation nur in Spuren vorhanden war. Dies wurde als Hinweis auf die Leber als primären Ort der Biotransformation gedeutet. Das Metabolitenmuster im 24 h-Urin der Ratte ließ keine Hauptmetaboliten erkennen, die Radioaktivität war über das ganze HPL-Chromatogramm verteilt. Viele, stark polare Abbauprodukte konnten nicht identifiziert werden.

Auch im Urin der anderen Spezies konnten nur wenige der radioaktiven Komponenten bekannten Strukturen aus der vorangegangenen Publikation (Maurer et al., 1982) zugeordnet werden. Hinsichtlich der quantitativen Verteilung der Metaboliten im HPL-Chromatogramm wurden große tierartliche Unterschiede

festgestellt. Hauptmetaboliten im Urin, der insgesamt nur 1 - 6 % der applizierten Dosis enthielt, waren jedoch bei allen Tierarten diejenigen Verbindungen, die aus der oxidativen Hydrolyse der Amidbindung hervorgegangen waren und deren Isomere.

Diese Substanzen vertraten auch 50 % der mit dem Urin eliminierten Radioaktivität (6 % d. appl. Dosis) beim Menschen. Im 24 h-Urin des Hundes konnten nur 14 % der eliminierten Dosis bekannten Verbindungen zugeordnet werden. Das Metabolitenmuster ähnelte dem des Menschen, das jedoch aufgrund der beim Menschen bevorzugt biliären Elimination von BC und seinen Metaboliten die wesentlichen Schritte der Biotransformation nicht widerspiegelte. Zur Erhellung der verschiedenen Abbauewege wurden Studien mit Mikrosomenpräparationen aus menschlicher Leber durchgeführt. Die hieraus hervorgegangenen Metaboliten waren identisch mit den aus der Galle bzw. den Hepatozyten der Ratte isolierten Strukturen. Aus dieser Tatsache wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Biotransformation von BC bei Versuchstier und Mensch denselben Wegen folgt.

Als dritter Vertreter der Stoffklasse der Ergotalkaloide soll im folgenden die Biotransformation von Lisurid beschrieben werden.

Lisurid gehört wie LSD zur Gruppe der Ergoline (Strukturformel s. Abb. 2).

Es leitet sich von der Isolysergsäure ab, bei der sich die Carboxylfunktion in 8 α -Stellung befindet (Lysergsäure: 8 β -Stellung). Im Fall von Lisurid ist in 8 α -Position ein Harnstoffrest (1,1-Diethylharnstoff) substituiert (LSD: Diethylamidgruppe), so daß weder Lysergsäure noch Isolysergsäure

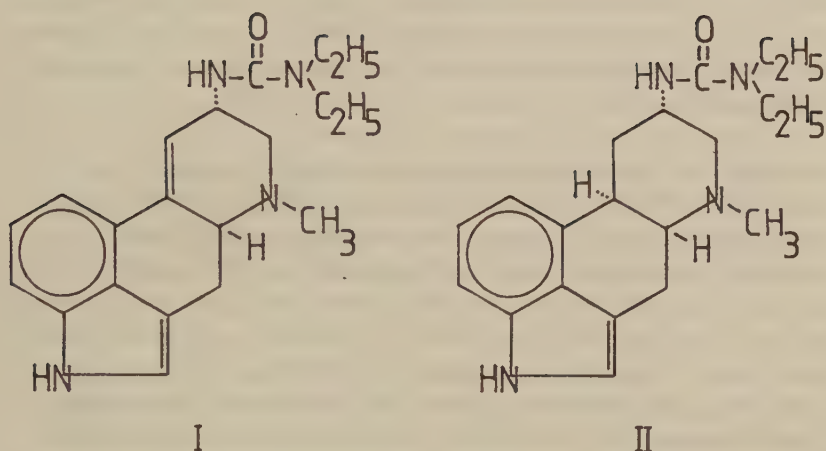


Abb. 2: Strukturformeln von Lisurid (I) und Tergurid (II)

aus Lisurid entstehen kann. Wenngleich die Derivate der Iso-lysergsäure als pharmakologisch inaktiv angesehen wurden, besitzen Lisurid und dessen Abkömmlinge (z.B. Tergurid als 9,10-Dihydrolisurid) ausgeprägte neuropharmakologische Wirkungen.

Zur Biotransformation von Lisurid führten Toda und Oshino (1980) Experimente mit ^{14}C -Lisurid unter in vitro und in vivo Bedingungen durch. Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber diente zur Bereitstellung ausreichender Mengen von Metaboliten. Insgesamt 5 mg ^{14}C -Lisurid/Leber wurden dem Perfusat via Dauertropfinfusion über 90 min zugesetzt. Das Perfusionsystem entsprach weitgehend den Angaben von Sugano et al. (1978). Es wurde ein vollsynthetisches Perfusionsmedium, bestehend aus Krebs-Henseleit- NaHCO_3 -Puffer pH 7.4, dem Glucose (10 mM), jedoch kein Albumin zugesetzt wurde, im rezirkulierenden System verwendet.

Nach 120 min Perfusion wurden Perfusat und Galle über eine Amberlite XAD-2 Säule vorgereinigt. Die Isolierung der Metaboliten erfolgte mittels präparativer TLC, deren Identifizierung mit spektroskopischen Methoden (UV, Fluoreszenz, ^1H -NMR, MS). Im Perfusat konnten alle 7, in der Galle 4 von 5 Abbauprodukten strukturell aufgeklärt werden.

Die bekannten Verbindungen wurden TL-Chromatogrammen aus einer Verteilungsstudie am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (1 mg ^{14}C -Lisurid/Leber) zugeordnet. Nach 120 min enthielt das Perfusat 39 % der applizierten Radioaktivität, die Galle ebenfalls 39 % und die Leber 10 %. Das Metabolitenmuster blieb über den ganzen Perfusionszeitraum hinweg nahezu unverändert. Lisurid wurde fast vollständig metabolisiert. Im Perfusat waren N'-Monodesethyl-Lisurid und N₆-Desmethyl-N'-monodesethyl-Lisurid mit 18 und 15 % der in dieser Probe enthaltenen Gesamtradioaktivität als Hauptmetaboliten vertreten. N₆-Desmethyl-Lisurid, 2-Oxo-Lisurid, N'-Didesethyl-Lisurid, Hydroxy-Lisurid (genaue Position am A-Ring nicht bestimmt) und sein Glucuronid hatten weniger als 8 % Anteil. In der Galle war das Glucuronid von Hydroxy-Lisurid mit 31 % der Gesamtradioaktivität der Hauptmetabolit. Weitere Abbauprodukte von geringerer mengenmäßiger Bedeutung waren Hydroxy-Lisurid, N'-Monodesethyl-Lisurid, N'-Didesethyl-Lisurid und eine nicht identifizierte Verbindung, für die eine Struktur mit geöffnetem B-Ring diskutiert wurde.

In vitro Studien an Gewebekomogenaten verschiedener Organe und an der Mikrosomenfraktion aus Leberhomogenat sollten die Vorrangigkeit des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber bezüglich der Übertragbarkeit seiner Ergebnisse auf in vivo Verhältnisse bestätigen.

Im Leberhomogenat und der Mikrosomenfraktion herrschten N-Desalkylierungsreaktionen (N₆-Desmethyl-Lisurid und N'-Monodesethyl-Lisurid) vor, während Hydroxy-Lisurid und 2-Oxo-Lisurid

von geringerer Bedeutung waren. Die Homogenate anderer Organe (Niere, Nebenniere, Gehirn, Lunge und Milz der Ratte) setzten Lisurid ausschließlich zu N_6 -Desmethyl-Lisurid um.

Im Ganztierversuch schied die Ratte nach zweiwöchiger täglicher Gabe von 0.25 mg/kg ^{14}C -Lisurid p.o. an den Tagen 1, 7 und 14 gleichbleibend etwa 14 % der applizierten Dosis im Urin aus. Hauptmetaboliten waren das Glucuronid von Hydroxy-Lisurid und die unbekannte Verbindung mit 32 - 42 % der Gesamtradioaktivität. Hydroxy-Lisurid, N_6 -Desmethyl-N'-monodesethyl-Lisurid und N'-Monodesethyl-Lisurid waren deutlich schwächer vertreten.

Toda und Oshino postulierten die Monooxygenierung und oxidative N-Desalkylierung als die beiden Hauptwege der Biotransformation von Lisurid. Die Vorteile der isoliert perfundierten Rattenleber wurden herausgestellt: Während Versuche mit Gewebekomogenaten fast ausschließlich N-Desalkylierungsreaktionen aufwiesen, reflektierten die aus dem Perfusat erhaltenen Metabolitenmuster sehr viel besser die in vivo Verhältnisse, bei denen auch die Monooxygenierung eine wesentliche Rolle spielte. Es wurde nochmals auf die Nützlichkeit dieses Modells in bezug auf Metabolisierungsstudien mit hoch toxischen Verbindungen hingewiesen.

Hümpel et al. (1984) untersuchten die Pharmakokinetik und Biotransformation von Lisurid an Rhesusaffe und Mensch. Eine Metabolitenisolierung aus humanem Urin war aufgrund der hohen pharmakologischen Wirksamkeit von Lisurid und der daraus resultierenden niedrigen Dosierung beim Menschen nicht möglich. Statt dessen wurden die Abbauprodukte aus dem Harn von Rhesusaffen isoliert und identifiziert und als Referenzsubstanzen den Metabolitenmustern aus biologischen Proben der Studie am Menschen zugeordnet.

3 Rhesusaffen erhielten 10 mg/kg ^{14}C -Lisurid intragastral. 2 Tage später wurde nicht radioaktiv markiertes Lisurid appliziert. Der 12 h-Urin beider Versuche, der etwa 30 % der Dosis enthielt, wurde zusammengegeben, so daß etwa 100 mg Lisurid-metaboliten als Ausgangsbasis für die Isolierung zur Verfügung standen. Dieser Harnpool wurde über eine Amberlite XAD-2 Säule konzentriert und entsalzt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe präparativer HPLC über Säulen absteigenden Innendurchmessers (16 mm, 8 mm, 4.6 mm). Zur Identifizierung der isolierten Metaboliten dienten spektroskopische Methoden (IR, ^1H -NMR, MS). Für 5 von 6 isolierten Verbindungen konnten Strukturvorschläge erbracht werden. Hauptmetabolit war das N'-Monodesethyl-Lisurid. Als weitere Abbauprodukte wurden ein im C-Ring aromatisiertes 2-Oxo-9-hydroxy-Lisurid und 2-Oxo-9-hydroxy-N'-monodesethyl-Lisurid, 2-Oxo-3 β -hydroxy-Lisurid und Hydroxy-9,10-epoxy-N'-didesethyl-Lisurid (genaue Position der Hydroxylgruppe am A-Ring nicht bestimmt) identifiziert.

Die Metabolitenmuster aus Plasma und Urin des Menschen wurden mit Hilfe analytischer HPLC erstellt. Alle aus dem Affenurin isolierten Metaboliten waren, wenngleich in unterschiedlichen Mengen, auch im humanen Urin vertreten. 50 % der mit Ethylacetat frei extrahierbaren humanen Metaboliten (entspr. 13 % der Dosis) konnten identifizierten Strukturen zugeordnet werden. Hauptmetabolit im 24 h-Urin war das 2-Oxo-3 β -hydroxy-Lisurid (6 - 7 % der Dosis). Der Wirkstoff wurde nahezu vollständig zu zahlreichen Metaboliten abgebaut. Dabei zeigten die Metabolitenmuster aus dem Urinextrakt des Menschen (50 % der Dosis wurden renal eliminiert) nach i.v. (0.025 mg) und p.o. (0.2 mg) Applikation keine deutlich erkennbaren Unterschiede, während der Vergleich zwischen Mustern aus Urin und Plasma erhebliche Differenzen erbrachte. So konnte im Plasma

(4 h p. oraler Appl.) nur der unveränderte Wirkstoff identifiziert werden, 2 weitere, mengenmäßig relevante Abbauprodukte waren den bekannten Strukturen nicht zuzuordnen. Die Autoren schlossen daraus auf unterschiedliche Clearance-Raten einzelner Metaboliten bzw. verschiedene Eliminationsrouten dieser Abbauprodukte.

Aus den Strukturen der identifizierten Verbindungen wurden unabhängig voneinander ablaufende Mechanismen der Biotransformation (Kombination von N-Desalkylierung, Hydroxylierung des aromatischen Ringsystems, Oxidation von Doppelbindungen und Epoxidation) im Gegensatz zu einem "step-by-step" Abbau postuliert.

Weiterhin wurde noch auf die großen Speziesunterschiede bezüglich der Wege der Biotransformation von Lisurid zwischen Ratte (Toda u. Oshino, 1980) und Primaten hingewiesen. So trat z.B. die Desmethylierung am N-6 bei Primaten nicht auf, während bei der Ratte die 9,10-Doppelbindung unberührt blieb. Die Monooxygenierung am C-2 wurde bei allen untersuchten Spezies beobachtet, beim Primaten häufig mit einer Hydroxylgruppe am C-3 vergesellschaftet. Die oxidative Desalkylierung am Harnstoffteil des Moleküls trat in allen beobachteten Versuchen auf und dürfte nach den Autoren der Hauptweg der Biotransformation von Lisurid beim Menschen sein. Phase II-Reaktionen waren quantitativ von untergeordneter Bedeutung.

III. METHODIK

1. Perfusion der isolierten Rattenleber

1.1 ^3H -Tergurid

$9,10\text{-}^3\text{H}$ -Tergurid wurde in den Labors der Fa. Amersham/Buchler (Braunschweig) aus der entsprechenden $9,10$ -Dehydro-Vorstufe durch Hydrieren mit T_2 -Gas (Tritiumgas) hergestellt. Die Markierung befand sich in $9,10$ -Position des Ringsystems.

Nach Aufreinigung der Rohsubstanz im Department Isotopenchemie der Schering AG, Berlin, betrug die spezifische Aktivität der Substanz 1360.7 MBq/mg .

Die radiochemische Reinheit des markierten Materials wurde mittels Dünnschichtchromatographie (System A: Aceton/Benzol/Ether/Ammoniak - $30/20/5/15$, System B: n -Butanol/Wasser/Eisessig - $45/12/3$, v/v) überprüft und betrug in beiden Systemen 97% .

^3H -Tergurid wurde in allen in vivo und in vitro Versuchen mit inaktiver Substanz versetzt.

1.2 Perfusionsapparatur

Der Aufbau der Apparatur entsprach weitgehend der Anordnung nach Miller et al. (1951). Das Perfusat wurde mit einer Rollenschlauchpumpe aus einem Vorratsgefäß zum Filmoxygenator befördert. Dort erfolgte der Gasaustausch (O_2/CO_2 , $95/5$, v/v, wasserdampfgesättigt) nach dem Gegenstromprinzip. Anschließend durchströmte das Perfusat die Leber in einer feuchten Kammer in porto-cavaler Richtung und floß wieder in das Vorratsgefäß zurück (geschlossenes System).

Die Thermokonstanz in der Apparatur ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) wurde durch einen Heizventilator, der durch ein Kontaktthermometer gesteuert wurde, gewährleistet.

Um keimarm perfundieren zu können, wurden Glasteile im Autoklaven (Fa. Deutsch u. Neumann, Berlin) bis 120°C sterilisiert und hitzeempfindliche Teile 12 h in eine Waschlauge gelegt. Sie wurden vor ihrem Einsatz gründlich mit heißem Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau der Perfusionsapparatur.

1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche SPF Wistar-Han Ratten aus der Zucht der Schering AG, Berlin, mit 190 - 210 g Körpermasse (Fütterung und Haltung s. 3.1.1)

1.4 Operationstechnik

Die Operationstechnik entsprach weitgehend derjenigen von Meijer et al (1981).

Die Tiere wurden mit Pentobarbital-Na (Nembutal^R, Cera GmbH, Bad Segeberg, 60 mg/kg i.v.) narkotisiert und in Rückenlage fixiert.

Das Abdomen wurde entlang der Linea alba eröffnet und das Darmkonvolut nach Anlegung parakostaler Entlastungsschnitte extraperitoneal verlagert. Nun wurden in situ der gemeinsame Gallengang und die Vena portae katheterisiert. Über den Venenkatheter wurde die Leber sofort mit Perfusionsmedium versorgt. Durch Inzision der Vena cava abdominalis wurde ein intrahepatischer Perfusatstau verhindert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, die Vena cava thoracis über Inzision des rechten

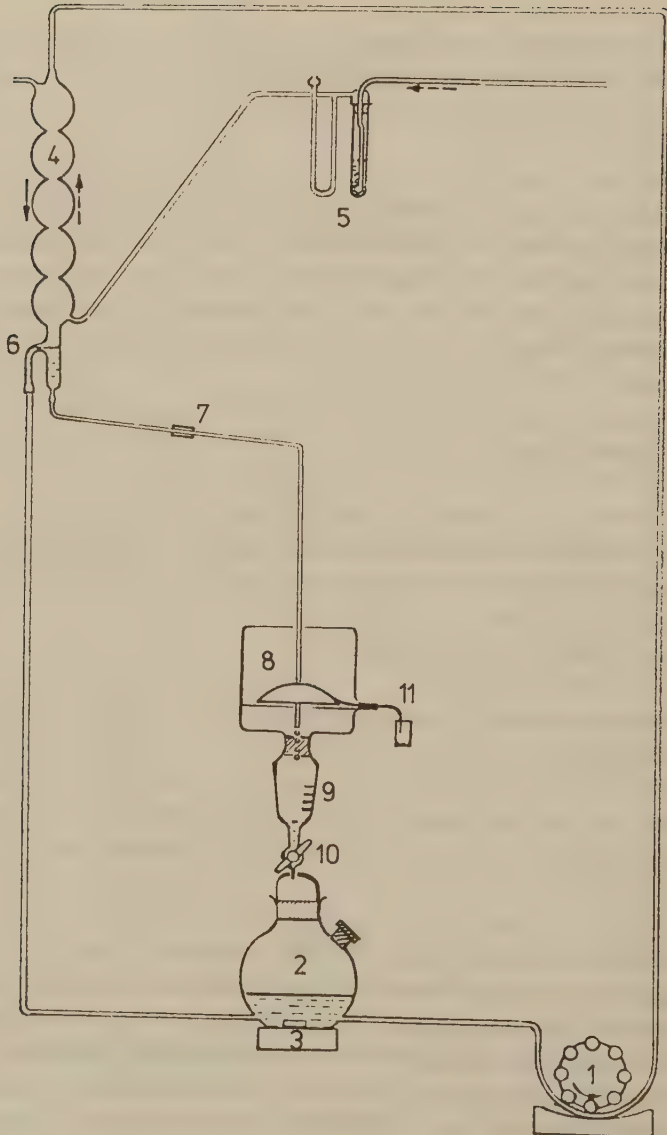


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Perfusionsapparatur
1 Rollenschlauchpumpe; 2 Vorratsgefäß; 3 Magnet-
rührer; 4 Filmoxygenator; 5 Waschflaschensystem; 6
Überlauf; 7 Durchflußregler; 8 Feuchte Kammer mit
Leber; 9 graduiertes Glasgefäß; 10 Hahn; 11 Gallen-
katheter mit Auffanggefäß

Atrium cordis katheterisiert und der Perfusionskreislauf durch Anziehen einer Ligatur um die Vena cava abdominalis cranial des Abgangs der rechten Vena renalis geschlossen. Die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr während der Präparation betrug maximal 4 min.

Das Organ wurde daraufhin vorsichtig freipräpariert, mit Perfusat gewaschen und in die feuchte Kammer der Perfusionsapparatur gelegt. Die Leber hing hier am Zuflußkatheter, ein kleinerer Teil, die in situ ventralen Bereiche, lag dem Boden der Kammer auf. Der Gallenkatheter führte über eine Aussparung in der Mitte der Decke der Kammer nach außen in ein Auffanggefäß. Die Galle wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. $0.5 \mu\text{l/min} \times \text{g Leber}$ gewonnen.

Die Durchflußrate des Perfusats wurde auf ca. $3 \text{ ml/min} \times \text{g Leber}$ eingestellt.

1.5 Zusammensetzung des Perfusionsmediums

Die Zusammensetzung des Perfusats (pH 7.4) entsprach weitgehend den Angaben von Meijer et al. (1981) und ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Perfusats

Substanz	Konzentration
NaCl	118.0 mmol/l
KCl	5.0 "
MgSO ₄	1.1 "
CaCl ₂	2.5 "
KH ₂ PO ₄	1.2 "
NaHCO ₃	25.0 "
Glucose	1.08 g/l
Albumin aus Rinderserum	10.00 "
Ampicillin	10.00 mg/l

1.6 Versuchsdurchführung

Nach der Operation wurde die Leber 30 min ohne Substanzzugabe perfundiert. Während dieser Periode der Vorperfusion wurden regelmäßig Durchflußrate und pH-Wert des Perfusats und das Gallevolumen kontrolliert. Nach 30 min wurde das Perfusionsmedium durch ca. 120 ml frisches ersetzt.

Die Hauptperfusion wurde mit fraktionierter Substanzzugabe begonnen. Je 2.4 mg (entspr. 400 KBq) ^3H -Tergurid wurden unter Zugabe von 1 n HCl in 6 ml Perfusat gelöst und zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30 und 40 min in das Vorratsgefäß pipettiert. Insgesamt wurde pro Perfusion 12 mg (entspr. 2 MBq) Substanz eingesetzt. Durchflußrate und pH-Wert des Perfusats und das Gallevolumen wurden regelmäßig kontrolliert. Die Leber wurde auf makroskopische Organveränderungen untersucht.

Nach 90 min. wurde die Hauptperfusion abgebrochen und Lebergewicht, Galle- und Perfusatvolumen bestimmt. Die Proben wurden daraufhin im Tiefkühlschrank eingefroren und bis zur Analyse bei -18°C aufbewahrt.

Die Apparatur wurde einmal mit Aqua bidest. und anschließend zweimal mit Aqua bidest./Methanol 50/50 v/v gespült. Ein Aliquot dieser Spülflüssigkeiten wurde ebenfalls nach Einfrieren bei -18°C aufbewahrt.

Bei der Durchführung der Versuche erwiesen sich 5 Leberperfusionen mit einem Gesamteinsatz von 60 mg (entspr. 10 MBq) ^3H -Tergurid als ausreichend, um die erforderlichen Mengen an Metaboliten gewinnen zu können.

1.7 Analytik

1.7.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Ein Aliquot von 0.05 ml des Perfusats (0 und 90 min) und je 0.5 ml der drei Waschphasen wurden direkt gemessen.

Die Galle der Hauptperfusion wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ml verdünnt und hiervon ein Aliquot von 0.05 ml gemessen.

Die Leber wurde mit einer Schere vorzerkleinert, das so erhaltene, grobe Homogenat mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 5-fache Volumen (bezogen auf das Feuchtgewicht der Leber) aufgefüllt und im Glas-Teflon-Potter (B. Bräun AG, Melsungen) homogenisiert. Ein Aliquot von 0.5 ml des Homogenats wurde gemessen.

Alle Proben (Doppelansätze) wurden mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und im Flüssigszintillationsspektrometer (Typ Betaszint BF 8000, Fa. Berthold, Wildbad) gegen 3 Leerwerte (aliquote Teile nicht radioaktiven Materials mit Szintillationsflüssigkeit) gemessen. Der statistische Zählfehler betrug max. 3 %. Die Quenchkontrolle und, falls erforderlich, -korrektur erfolgte anhand des externen Standards und des Kanalverhältnisses. Weitere Berechnungen basierten auf derart hochgerechneten Werten.

1.7.2 HPLC-Methode

Zum Prinzip der Methode s. 2.1.1

Zu 0.1 ml Perfusat (0 und 90 min) wurden tropfenweise 0.4 ml Aceton/Methanol 75/25 v/v unter Durchmischung auf dem Whirl-Mix (Fa. Janke u. Kunkel, Staufen i. Brsg.) zugegeben. Das ausgefallene Eiweiß wurde abzentrifugiert (ca. 2000 g, 10 min) und der Überstand im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt.

Der Rückstand wurde in 0.15 ml 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol 50/50 v/v aufgenommen und auf eine LiChrosorb RP2 10 μm -Säule (Länge 250 mm, Innendurchmesser 4.6 mm) mit Vorsäule gleichen Füllmaterials injiziert. Der Fluß betrug 2.0 ml/min, der Druck 8.3 - 13.8 MPa.

Die Eluentien bestanden aus einer Mischung von 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol und wurden vor Gebrauch ca. 10 min mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Während der Analyse wurde der Methanolanteil im Eluens innerhalb von 25 min von 10 auf 70 % gesteigert. Innerhalb der nächsten 5 min erreichte er 100 %. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen (3.3 Fraktionen/min). Die Fraktionen wurden mit 4.5 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und im Flüssigszintillationsspektrometer (Typ 1212 Rackbeta, Fa. LKB, Wallac-Finnland) gemessen. Der statistische Zählfehler betrug max. 3 %.

- 2. Metabolitenisolierung und -identifizierung
- 2.1 HPLC - High Performance Liquid Chromatography
- 2.1.1 Prinzip der Methode

Als Chromatographie bezeichnet man einen Trennprozeß, der auf der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Bestandteile eines Substanzgemisches zwischen 2 Phasen, der stationären und der mobilen Phase, beruht. Bei der HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Hoch-Leistungs-Flüssig-Chromatographie) wird das zu analysierende Substanzgemisch auf eine Säule aufgebracht, die mit der stationären Phase - einem feinstkörnigen Material mit großer spezifischer Oberfläche - gefüllt ist, und unter hohem Druck mit der mobilen Phase eluiert.

Das klassische HPLC-Verfahren bedient sich einer polaren stationären (z.B. Kieselgel) und einer apolaren mobilen Phase (z.B. Hexan). Bei der hier eingesetzten Reversed-phase-Chromatographie (Chromatographie mit Phasenumkehr) sind die Verhältnisse genau umgekehrt: die stationäre Phase ist apolar (z.B. Dimethylgruppen, die an ein Kieselgelgrundgerüst gebunden sind), die mobile polar (z.B. Methanol, Wasser).

Je nach Ausmaß ihrer Lipophilität wird sich eine Substanz zwischen beiden Phasen verteilen. Durch das Vorbeifließen der mobilen an der stationären Phase stellen sich immer wieder neue Verteilungsgleichgewichte ein, die im Endeffekt zur Elution der Substanz in einem bestimmten Elutionsvolumen führen. Bei konstantem Fluß wird dieses Elutionsvolumen auch als Retentionszeit charakterisiert. Zur Verringerung der Elutionsvolumina (Verkürzung der Retentionszeiten) von Substanzen sehr unterschiedlicher Polarität in einer Trennmischung wurde in der vorliegenden Arbeit häufig eine Elutionsmethode benutzt, bei der der weniger polare Teil des Elutionsgemisches linear mit der Zeit erhöht wurde (Gradientensystem).

Dabei wird zu Beginn der Elution die mobile Phase genau so polar gewählt, daß die polarsten Substanzen gerade noch von der stationären Phase zurückgehalten werden. Im weiteren Verlauf wird ein Eluens mit größerer Elutionskraft (höherer Apolarität) eingesetzt, so daß auch weniger polare Komponenten noch mit einer vertretbaren Retentionszeit eluiert werden.

Das von der Säule kommende Eluat wird durch einen Durchflußdetektor (UV, Fluoreszenz) geleitet und/ oder fraktioniert aufgefangen.

Die vom UV- bzw. Fluoreszenzdetektor abgegebenen Signale werden mit einem Analogschreiber registriert (Chromatogramm). Hier wurde in den einzelnen Fraktionen die Radioaktivität gemessen und so ein Radiochromatogramm des entsprechenden HPLC-Laufs erstellt. Abbildung 4 zeigt das HPL-Chromatogramm von Tergurid (HPLC-Parameter s. 1.7.2).

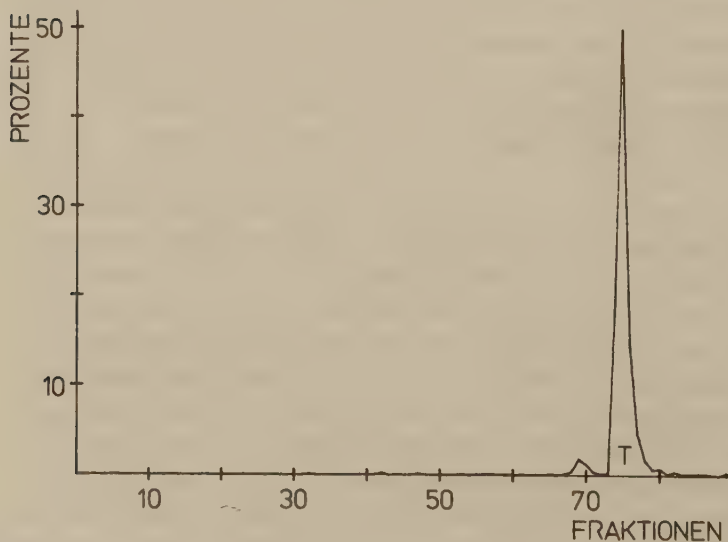


Abb. 4: HPL-Chromatogramm von ^3H -Tergurid
HPLC-Parameter s. 1.7.2

2.1.2 Präparative HPLC

2.1.2.1 Kurze Übersicht über den Verlauf der Metaboliten-isolierung aus dem Perfusatgemisch

Der Verlauf der Isolierung entsprach weitgehend dem Vorgehen von Humpel et al. (1984) bei der Biotransformationsstudie mit Lisurid.

Die Isolierung der Metaboliten erfolgte über verschiedene präparative HPLC-Systeme (Phasen), die mit jeder fortschreitenden Phase völlig neue Metabolitenmuster lieferten, was wiederum eine daran angepaßte Einteilung der Radiochromatogramme mit entsprechender Benennung forderte. Zur besseren Übersichtlichkeit folgt hier ein Kurzaßriß der verschiedenen Phasen mit der zugehörigen Einteilung der HPL-Chromatogramme.

Phase I: Das verdünnte Perfusatgemisch wurde über eine 16 mm-Säule in die Bereiche (B) 1 - 4 aufgetrennt. Da das Ausgangsvolumen für einen Einzelablauf zu groß war, wurden 20 % davon in 5 identischen Versuchsabläufen eingesetzt.

Phase II: Die Metabolitengemische aus den Bereichen 1 - 4 wurden über 4 verschiedene HPLC-Systeme (8 mm-Säule) in insgesamt 7 Unterbereiche (UB) 1 - 7 aufgetrennt. Die Unterbereiche 3 - 6 hatten eine zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie ausreichende radiochemische Reinheit.

Phase III: Die Metabolitengemische aus den Unterbereichen 1 und 2 wurden über 2 verschiedene HPLC-Systeme (4.5 mm-Säule) in die Metabolitenbereiche (MB 1 a - c und 2 a - d) aufgetrennt. Unterbereich 7 wurde zu Kontrollzwecken ebenfalls weitergereinigt und ergab "Metabolitenbereich" 7 (entspr. Tergurid). Alle Metabolitenbereiche wurden zur Identifizierung abgegeben.

Identifizierte Metaboliten wurden mit dem Großbuchstaben M und - nach ihren Retentionszeiten im analytischen System - mit den römischen Ziffern I - VII benannt.

Die analytische Auftrennung der organischen Proben machte eine Einteilung der resultierenden HPL-Chromatogramme in Metabolitenzonen (MZ) X, A - D und T nötig, die teilweise mehrere Metaboliten enthielten und mit der Einteilung der über die präparative HPLC erhaltenen Radiochromatogramme nichts gemeinsam hatten.

2.1.2.2 Phase I (16 mm-Säule)

Die Perfusate (90 min) aus den in vitro Versuchen wurden vereinigt. Ein Aliquot von 0.1 ml dieses Gemisches diente der Radioaktivitätsmessung, ein weiteres der Erstellung eines Radiochromatogramms (HPLC-Parameter s. 1.7.2).

Das Perfusatgemisch (ca. 750 ml) wurde über ein Faltenfilter gegeben und mit dem doppelten Volumen Aqua bidest. verdünnt.

Schritt I: Ein Teil (ca. 20 % entspr. 150 ml) der Lösung wurde direkt von einer HPLC-Pumpe mit einem Fluß von 2 ml/min angesaugt und bei einem Druck von 0.7 MPa auf eine LiChrosorb RP2 10µm-Säule (Länge 250 mm, ID 16 mm) aufgepumpt.

Schritt II: Um ein Ausfallen des Albumins bei der späteren Elution mit Methanol zu verhindern, wurde die Säule anschließend bei einem Fluß von 8 ml/min und einem Druck von 3.4 MPa mit dem doppelten Volumen der aufgepumpten Lösung mit Aqua bidest. (ca. 900 ml) gespült.

Schritt III: Nach 10 min Equilibrierung mit 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ wurde der Methanolanteil im Eluens innerhalb von 90 min von 0 auf 70 % gesteigert. Der Fluß betrug 9 ml/min, der Druck 6.8 - 13.8 MPa.

Nach 3 min isokratischer Elution wurde der Methanolanteil innerhalb von 15 min auf 100 % erhöht und die Säule über weitere 15 min mit reinem Methanol gespült.

Das Eluat von Schritt I und II und das der letzten Methanolspülung wurde getrennt aufgefangen und von jeweils 0.1 ml die Radioaktivität bestimmt. Das Eluat von Schritt III wurde über ein Volumeter geleitet und in 2 Fraktionen/min in Glasgefäßen gesammelt. In einem Aliquot dieser Fraktionen von 0.1 ml wurde die Radioaktivität gemessen und daraus ein Radiochromatogramm erstellt.

Es wurden 5 HPLC-Läufe mit der 16 mm-Säule durchgeführt.

Die Radiochromatogramme wurden in 4 Bereiche eingeteilt und die entsprechenden Fraktionen zusammengegeben. Diese vereinigten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer (Rotavapor-SB, Büchi AG, Flawil/Schweiz) zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und erneut eingeeengt. Dieser Vorgang wurde zur weiteren Konzentrierung noch zweimal wiederholt.

Zur Kontrolle der verfahrensbedingten Verluste wurde nach jedem Aufarbeitungsschritt in einem Aliquot der methanolischen Lösungen von 0.1 ml die Radioaktivität bestimmt.

2.1.2.3 Phase II (8 mm-Säule)

Der Rückstand aus den Einengungsschritten wurde für Bereich 1 - 3 in 75/25 v/v, für Bereich 4 in 60/40 v/v 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol aufgenommen. Diese Lösungen (jeweils ca. 2 ml) wurden auf eine LiChrosorb RP2 10 μm -Säule (Länge 250 mm, ID 8 mm) injiziert. Weitere Parameter sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tab. 2: HPLC-Parameter für die Läufe von Bereiche (B) 1 - 4

	Eluens I	Eluens II	Equilibr.	Laufzeit
B 1	90/10*	40/60	5 min	60 min
B 2	90/10	40/60	5 min	60 min
B 3	80/20	30/70	5 min	60 min
B 4	60/40	30/70	-	30 min

* Die Eluentien bestanden aus einem Gemisch aus 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol

Die Elution erfolgte innerhalb der entsprechenden Laufzeit mit Hilfe eines linearen Gradienten von Eluens I auf Eluens II. Der Fluß betrug 8 ml/min, der Druck 13.8 - 27.6 MPa. Nach 3 min isokratischer Elution (Eluens II) wurde der Methanolanteil in 10 min auf 100 % erhöht. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Volumeters in 3 - 4 Fraktionen/min in Glasgefäßen gesammelt. In einem Aliquot dieser Fraktionen (0.01 ml) wurde die Radioaktivität gemessen und daraus ein Radiochromatogramm erstellt.

Die HPL-Chromatogramme der Bereiche 1 - 4 wurden nach den entsprechenden Radiochromatogrammen in verschiedene Unterbereiche eingeteilt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt (s. a. Abbildung 5).

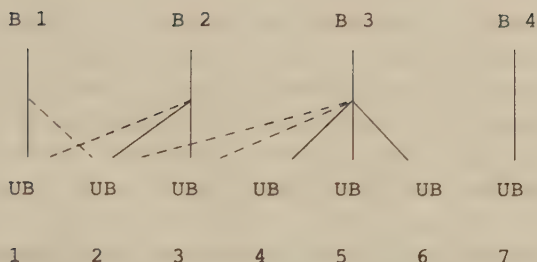


Abb. 5: Aufteilung der Bereiche (B) 1 - 4 auf die Unterbereiche (UB) 1 - 7
 — Hauptanteile,
 --- Nebenanteile, bedingt durch ungenügende chromatographische Auftrennung in Phase I der Metabolitenisolierung

Die Lösungen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 30 % des Ausgangsvolumens eingengt und anschließend gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Typ "L15", WKF GmbH, Brandau). Das Lyophilisat wurde in Methanol aufgenommen und im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt.

Zur Kontrolle der verfahrensbedingten Verluste wurde nach jedem Schritt in einem Aliquot der methanolischen Lösungen (0.01 ml) die Radioaktivität bestimmt.

Der Rückstand aus den Unterbereichen 1 - 6 wurde in 2 ml deuteriertem Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von ca. 10 µg wurde der massenspektrometrischen Untersuchung (MS, s. 2.2), der Rest der Kernresonanzspektroskopie (NMR, s. 2.3) zugeführt.

Nach ihrer Untersuchung wurden die Lösungen im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und bei -18°C aufbewahrt.

2.1.2.4 Phase III (4.6 mm-Säule)

Der Rückstand aus den Unterbereichen 1, 2 und 7 wurde in 0.25 ml Eluens aufgenommen und auf eine LiChrosorb RP8 5 μm -Säule (Länge 250 mm, ID 4.6 mm) injiziert. Weitere Parameter sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tab. 3: HPLC-Parameter für die Läufe von Unterbereich (UB) 1, 2 und 7

	Eluens	Laufzeit	Druck	Frakt./min
UB 1	60/40*	15 min	10.3 - 25.5 MPa	2.0
UB 2	60/40	30 min	10.3 - 25.5 MPa	3.3
UB 7	35/65	20 min	10.3 - 20.7 MPa	2.0

* Die Eluentien bestanden aus einem Gemisch aus 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol.

Nach der isokratischen Elution wurde der Methanolanteil im Eluens in 10 min auf 100 % erhöht.

Der Fluß betrug 1.5 ml/min. In einem Aliquot von 0.01 ml der in Glasgefäßen gesammelten Fraktionen wurde die Radioaktivität gemessen und daraus ein Radiochromatogramm erstellt.

Die HPL-Chromatogramme der Unterbereiche 1, 2 und 7 wurden nach den Radiochromatogrammen in verschiedene Metabolitenbereiche (MB 1 a - c, 2 a - d und MB 7) eingeteilt und die entsprechenden Fraktionen zusammengegeben. Diese vereinigten Fraktionen wurden im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt.

Der Rückstand wurde in 2 ml deuteriertem Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von ca. 10 μg wurde der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt, der Rest der Kernresonanzspektroskopie.

Nach ihrer Untersuchung wurden die Lösungen im Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt und bei -18°C aufbewahrt.

2.1.3 Analytische HPLC

Je ca. 170 Bq der Unterbereiche 3 - 6 und der Metabolitenbereiche 1 a - c und 2 a - d dienten der Erstellung von Radiochromatogrammen (HPLC-Parameter s. 1.7.2) zur Charakterisierung der Retentionszeiten der Metaboliten im Metabolitenmuster.

Referenzsubstanzen standen aufgrund der extrem schwierigen chemischen Synthese der identifizierten Metaboliten nicht zur Verfügung.

2.2 Massenspektrometrie

2.2.1 Prinzip der Methode

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung der Masse und Häufigkeit von Ionen.

Charakteristische Eigenschaften sind die große Empfindlichkeit und der hohe Informationsgehalt der Massenspektren hinsichtlich des Molekulargewichts und der Struktur der untersuchten Verbindung.

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle werden aus der gasförmigen Probensubstanz unter Hochvakuum durch Beschuß mit Elektronen oder geladenen Molekülen Ionen erzeugt, beschleunigt und zu einem Strahl gebündelt. Im Analysator werden die einfallenden Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/e -Wert) getrennt und im Detektor ihre Masse und Häufigkeit registriert.

Der erste Schritt einer massenspektrometrischen Analyse ist die Erzeugung gasförmiger Ionen aus der Probensubstanz. Beim Vorliegen einer Festsubstanz wird die Probe über eine Vakuumschleuse direkt in die unter Hochvakuum stehende Ionenquelle verbracht und durch Zufuhr von thermischer Energie in den gasförmigen Zustand überführt. Anschließend werden die nun im Gaszustand vorliegenden Moleküle ionisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ionisationstechniken angewendet: die Elektronenstoßionisation (EI-electron impact) und die Chemische Ionisation (CI). Bei der EI werden die Probenmoleküle durch Beschuß mit Elektronen ionisiert, wobei hauptsächlich einfach positiv geladene Radikationen $(M)^+$

entstehen. Bei der CI wird zunächst ein Reaktionsgas (hier: Methan) in die Ionenquelle eingelassen und durch Elektronenbeschuß ionisiert. Durch interne Ionen-Molekülreaktionen werden reaktive Ionen gebildet, die dann die Probenmoleküle durch Protonenübertragung oder Anlagerung ionisieren. Es entstehen nicht radikalische, einfach positiv geladene Molekülionen $(M+H)^+$. Meist liegt die eingesetzte Energie deutlich über der Ionisierungsenergie der Probensubstanz, so daß nicht nur das Molekül ionisiert wird, sondern auch intramolekulare Bindungen gesprengt werden und Fragmentionen auftreten.

Die gebildeten Ionen werden über ein elektrisches Potentialgefälle beschleunigt. Am Ende der Beschleunigungsstrecke werden sie mit Hilfe einer Blende zum Ionenstrahl gebündelt.

Dieser wird im Analysator durch ein homogenes magnetisches Sektorfeld nach Massen aufgefächert.

Beim hier verwendeten Quadrupol-Massenfilter wird die massenabhängige Resonanzfrequenz des bewegten Ions mit hochfrequenten elektrischen Wechselfeldern zur Massentrennung ausgenützt. Durch den Kollektorschlitze gelangen Ionen bestimmter Masse vom Analysator zum Detektor. Zum Nachweis der Ionen dienen Sekundärelektronenvervielfacher, Ionenauffänger oder Photoplatte.

Wird das Magnetfeld oder die Beschleunigungsspannung bzw. die Hochfrequenzspannung kontinuierlich verändert, so können nacheinander Ionen unterschiedlicher Masse nachgewiesen werden. Die Gesamtheit aller Massen bzw. m/e -Werte eines Laufs ergibt ein Massenspektrum der untersuchten Substanz.

Die Abbildungen 6a und 6b zeigen EI- bzw. CI-Massenspektren von Tergurid.

2.2.2 Durchführung

Es wurde ein Finnigan 4000 Massenspektrometer mit einem INCOS 2000 Datensystem benutzt, um die Massenspektren der isolierten Metaboliten zu erstellen.

Die Substanzen wurden direkt in die Ionenquelle eingelassen. Die Bedingungen für die Elektronenstoßionisation waren: Ionenquellentemperatur 250°C, Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 1.5 kV.

Für die Chemische Ionisation diente Methan als Reaktionsgas. Der Druck der Ionenquelle betrug 4×10^{-3} Pa.

Die Massenspektren wurden im Hauptdepartment Pharmakokinetik der Schering AG, Berlin, erstellt.

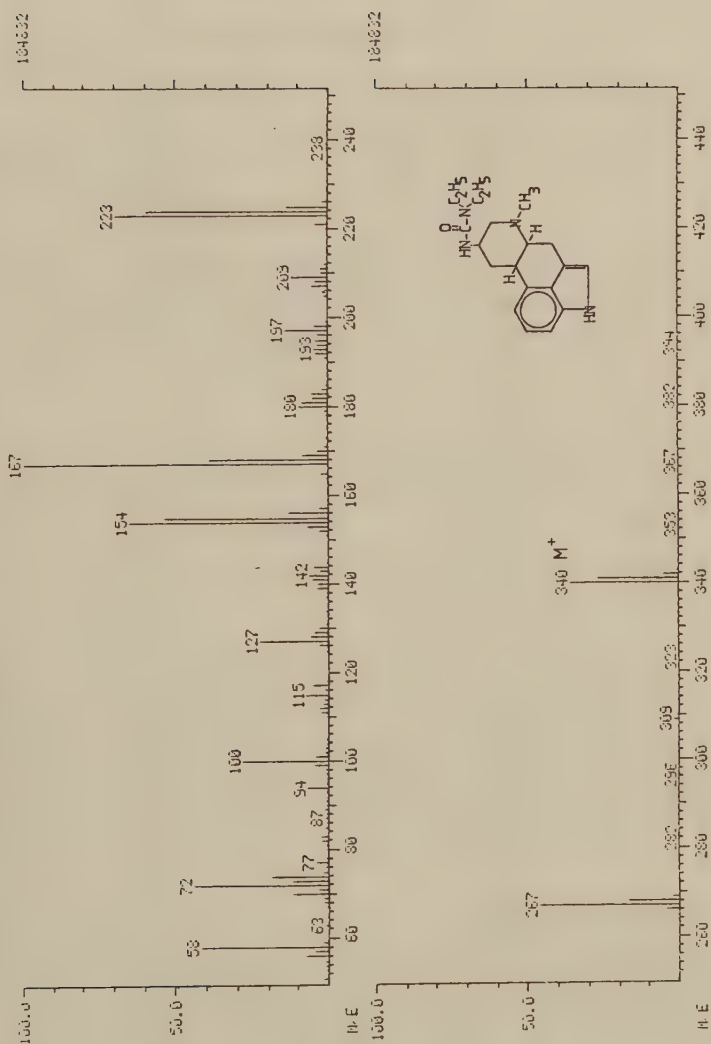
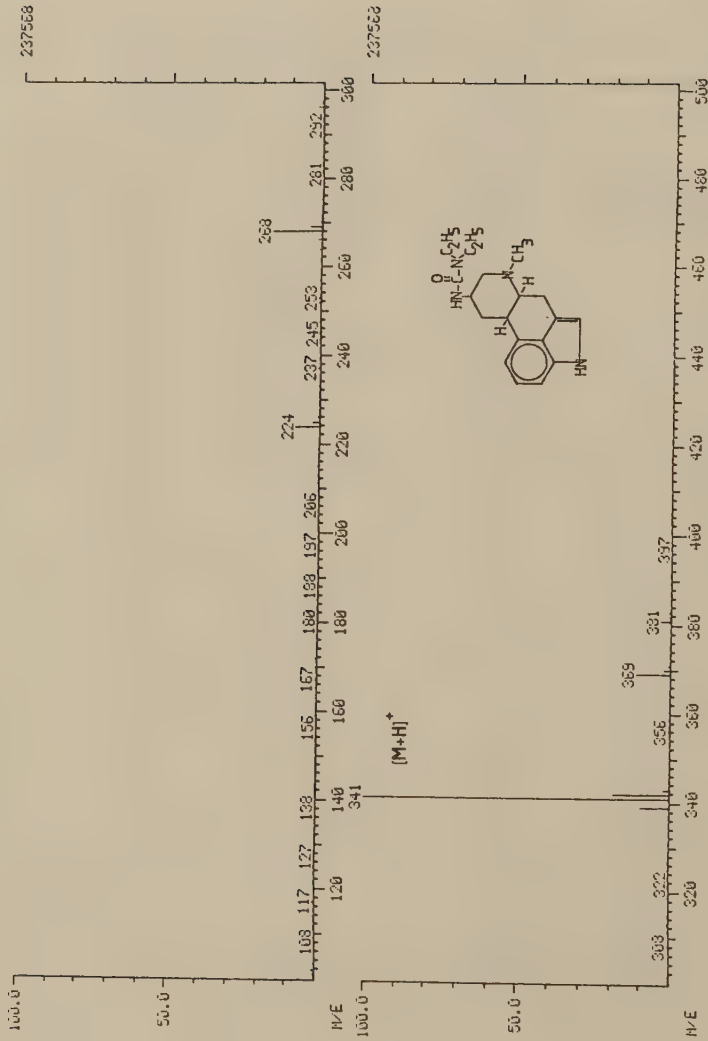


Abb. 6a: EI-Massenspektrum von Tergurid



2.3 Kernresonanzspektroskopie

2.3.1 Prinzip der Methode

Bei der magnetischen Kernresonanzspektroskopie oder NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie dient das physikalische Phänomen des Kernmagnetismus zur Strukturaufklärung von unbekannten Molekülen.

Nicht alle Atomkerne besitzen ein magnetisches Moment. Die Protonenresonanzspektroskopie, die hier eingesetzte Variante der NMR-Spektroskopie, bedient sich der Kernresonanz des Protons, ^1H .

Die zu messende Probe wird in gelöster Form in ein starkes Magnetfeld gebracht. In diesem Magnetfeld hängt die potentielle Energie der verschiedenen Protonen des Moleküls von ihrer Orientierung relativ zur Richtung des äußeren Feldes ab. Für das Proton sind nur zwei Energielagen stabil: die parallele und die antiparallele zur Richtung des äußeren Feldes. Zwischen diesen beiden Energieniveaus sind Übergänge möglich, die sich über Energiezufuhr durch elektromagnetische Strahlung induzieren lassen. Setzt man ein Proton einer charakteristischen chemischen Umgebung elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Frequenz (der sog. Resonanzfrequenz) aus, so nimmt dieses Energie aus dem Strahlungsfeld auf. Dieser Energiefluß ist die Grundlage für das Kernresonanzsignal.

Als Strahlenquelle oder Sender dient die Spule eines Schwingkreises, dessen Eigenschaften sich bei der Energieabsorption durch das Proton ändern. Diese Änderung wird mit Hilfe einer Brückenschaltung registriert. Verstärkung und Übertragung auf einen Schreiber gestatten die Bestimmung der Resonanzfrequenz durch Registrierung des Resonanzsignals.

Die Resonanzfrequenz ist für die verschiedenen Protonen eines Moleküls nicht identisch. Sie hängt ab von der lokalen Feldstärke in unmittelbarer Umgebung des Atomkerns, die bei einem Kern im Molekülverband nicht mit der Stärke des äußeren Magnetfeldes übereinstimmt. Das äußere Magnetfeld wird einerseits durch die Elektronenhüllen des betrachteten Kerns abgeschirmt und andererseits durch induzierte lokale Magnetfelder beeinflusst. Wichtige Parameter dieser sog. chemischen Verschiebung (des Resonanzsignals) sind u.a.

- induktive Effekte, die zur Änderung der Elektronendichte führen
- der Effekt der Anisotropie bestimmter chemischer Bindungen
- Van der Waals-Effekte.

Das Vorhandensein dieser zahlreichen Einflußgrößen erklärt die Tatsache, daß Protonen aus unterschiedlichen funktionellen Gruppen und Nachbarschaften unterschiedliche Resonanzfrequenzen haben.

Um Resonanzsignale aller im Molekül vertretenen Protonen, also ein Resonanzspektrum zu erhalten, wird im NMR-Spektrometer entweder bei vorgegebener Feldstärke die Frequenz geändert oder bei fixierter Frequenz das Magnetfeld variiert.

Abbildung 7 zeigt das NMR-Spektrum von Tergurid.

2.3.2 Durchführung

Die ^1H -NMR-Spektren der isolierten Metaboliten wurden mit einem Nicolet NT 360 WB Kernresonanzspektrometer angefertigt. Als Lösungsmittel diente deuteriertes Methanol. Das System wurde auf reines Methanol geeicht.

Die NMR-Spektren wurden im Department Spektrometrie der Schering AG, Berlin, erstellt.

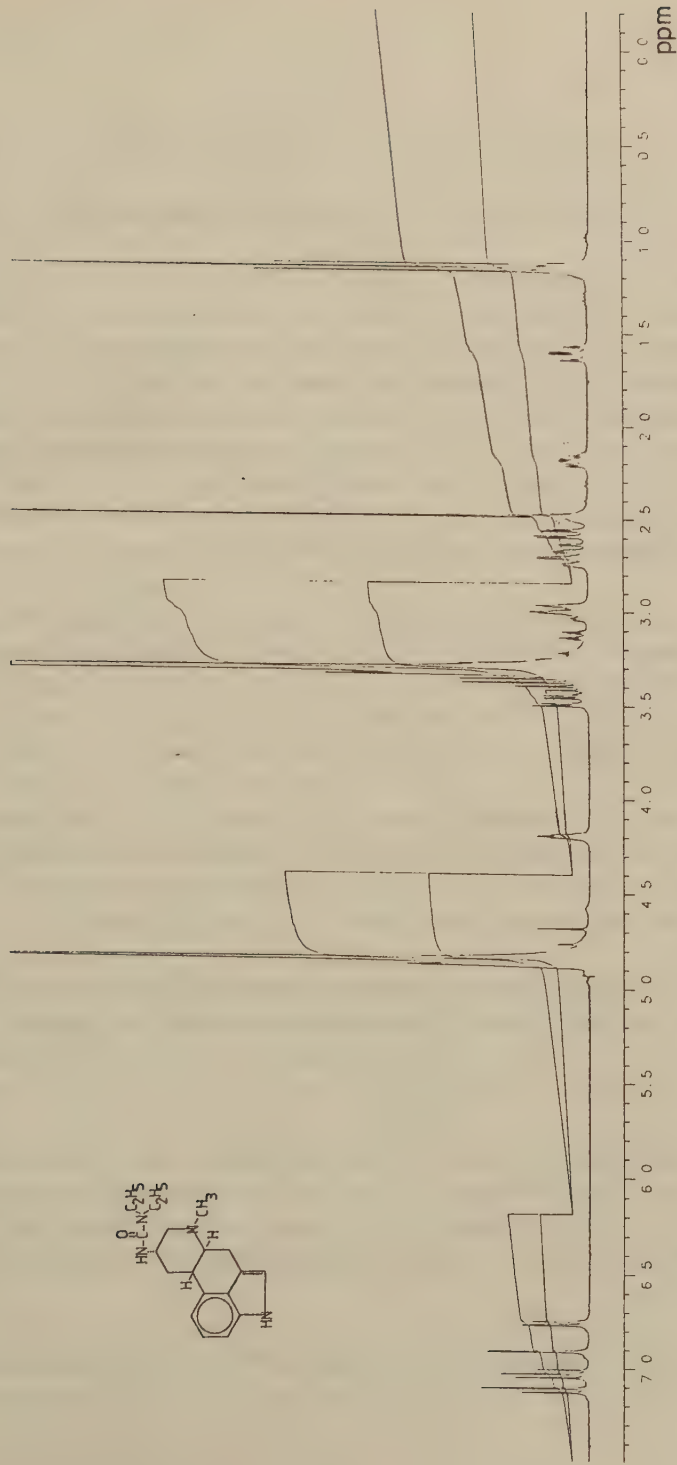


Abb. 7: ^1H -NMR-Spektrum von Tergurid

3. Studien am Ganztier

3.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung

3.1.1 Ratte

Als Versuchstiere dienten weibliche SPF Wistar-Han Ratten aus der Zucht der Schering AG, Berlin, mit 190 - 210 g Körpermasse. Sie wurden bis zum Versuch in Makrolon-Käfigen in Gruppen bis zu 15 Tieren gehalten. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit $60 \pm 20 \%$. Eine gleichmäßige Beleuchtung von mindestens 500 Lux/Raum war für 12 h am Tag gewährleistet.

Die Tiere erhielten die Standard-Diät tpf^{R} , Ratte/Maus-Haltung (Best.-Nr. 1324) der Fa. Altromin (Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

3.1.2 Hund

Als Versuchstiere dienten weibliche Beagles aus der Zucht der Fa. Winkelmann (Borchen) mit 9 - 11 kg Körpermasse. Sie wurden bis zum Versuch in Einzelboxen gehalten (Klimatisierung und Beleuchtung der Räume s. 3.1.1).

Die Tiere erhielten die Standard-Diät tpf^{R} , Hunde-Haltung (Best.-Nr. 4024) der Fa. Altromin und Wasser ad libitum.

3.1.3 Affe

Als Versuchstiere dienten weibliche Cynomolgen (*Macaca fascicularis*) aus Wildfängen (Vertrieb: Fa. Hazleton, Münster) mit 3 - 4 kg Körpermasse. Sie wurden bis zum Versuch in Einzelkäfigen gehalten (Klimatisierung und Beleuchtung der Räume s. 3.1.1).

Die Tiere erhielten die Standard-Diät tpf^{R} , Affen-Haltung (Best.-Nr. 6023) der Fa. Altromin und Wasser ad libitum.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Studien an der Ratte

Je 8 Tieren wurde 0.25 mg/kg (entspr. 13 MBq/kg) ^3H -Tergurid (gelöst in Phosphatpuffer pH 7 unter Zugabe von HCl - Konzentration: 0.25 mg/ml) intravenös bzw. intragastral verabreicht.

Den Tieren für die i.g.-Applikation wurde 12 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Nach der Applikation wurden die Tiere zur getrennten Sammlung von Urin und Faeces in Stoffwechselkäfige gesetzt und erhielten Futter und Wasser ad libitum (s. 3.1.1).

Zu den Zeitpunkten 0.5 h, 3 h und 8 h wurden je 2 Tiere in Ethernarkose entblutet. Sie wurden dazu in Rückenlage fixiert, die Bauchhöhle in der Medianen eröffnet und ca. 5 ml Blut in einer Monovette^R (Fa. Sarstedt, Nürnberg) durch Punktion der Vena cava caudalis gewonnen.

Der Urin der verbleibenden 2 Tiere wurde über 24 h gesammelt.

3.2.2 Studien am Hund

Je 3 Tieren (intraindividueller Versuchsansatz) wurde 0.1 mg/kg (entspr. 1.4 bzw. 4.6 MBq/kg) ^3H -Tergurid (gelöst in Phosphatpuffer pH 7 unter Zugabe von HCl - Konz.: 0.45 mg/ml bzw. 0.2 mg/ml) intravenös bzw. intragastral verabreicht.

Den Tieren für die i.g.-Applikation wurde 12 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Die Applikationen wurden im Abstand von 2 Wochen vorgenommen.

Nach der Applikation wurden die Tiere zur getrennten Sammlung von Urin und Faeces in Stoffwechselkäfige gesetzt und erhielten einmal täglich Futter (ca. 400 g PAL Alleinfuttermittel für Hunde (Effem GmbH, Verden), ca. 150 g gekochten Reis und 10 - 20 g extrahiertes Knochenmehl) und Wasser ad libitum.

Zu den Zeitpunkten 0.5 h, 3 h und 8 h wurden ca. 5 ml Blut aus der Vena saphena lateralis oder Vena cephalica entnommen und mit 0.05 ml Liquemin^R 2500 (LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen) versetzt. Der Urin wurde über 24 h gesammelt.

3.2.3 Studien am Affen

Je 3 Tieren (intraindividueller Versuchsansatz) wurde 0.1 mg/kg (entspr. 1.1 bzw. 3.2 MBq/kg) ³H-Tergurid (gelöst in Phosphatpuffer pH 7 unter Zugabe von HCl - Konz.: 0.45 mg/ml bzw. 0.1 mg/ml) intravenös bzw. intragastral verabreicht.

Den Tieren für die i.g.-Applikation wurde 12 h vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Die Applikationen wurden im Abstand von 2 Wochen vorgenommen.

Nach der Applikation wurden die Tiere zur getrennten Sammlung von Urin und Faeces in Stoffwechselkäfige gesetzt und erhielten Futter und Wasser ad libitum (s. 3.1.3). Zu den Zeitpunkten 0.5 h, 3 h und 8 h wurden ca. 5 ml Blut aus der Vena saphena lateralis oder der Vena cephalica entnommen und mit 0.05 ml Liquemin^R 2500 versetzt.

Der Urin wurde über 24 h gesammelt.

3.2.4 Allgemeines Schema der in vivo Versuche

Tabelle 4 zeigt zusammenfassend ein allgemeines Schema der in vivo Versuche mit ³H-Tergurid an den verschiedenen Spezies.

Tab. 4: Allgemeines Schema der in vivo Versuche mit ^3H -Tergurid (Blutentnahme 0.5 h, 3 h, 8 h p.appl., Urinsammlung über 24 h)

Spezies	Dosis (mg/kg)		radioaktive Dosis (MBq/kg)		Konzentration (mg/ml)	
	i.v.	i.g.	i.v.	i.g.	i.v.	i.g.
Ratte	0.25	0.25	13.0	13.0	0.25	0.25
Hund	0.1	0.1	1.4	4.6	0.45	0.2
Affe	0.1	0.1	1.1	3.2	0.45	0.1

3.3 Analytik

3.3.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Das heparinisierte Blut wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert (ca. 1000 g, 20 min). Das Plasma wurde abpipettiert und ein Aliquot von 0.05 ml (Doppelansatz) mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und im Flüssigszintillationsspektrometer (Typ Betaszint BF 8000, Fa. Berthold, Wildbad) gemessen. Der statistische Zählfehler betrug max. 3 %.

Zur Standardisierung (Analogstandard) wurde ein exakt abgemessener Teil der verabreichten Formulierung in Methanol gelöst und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Es wurden je 2 Standards erstellt. Den Anfang jeder Meßreihe bildeten 6 Proben, die nicht radioaktiv markiertes Plasma enthielten. 3 dieser Proben wurden mit einer bekannten Menge der Standardlösungen versetzt, die anderen 3 dienten als Leerwerte. Die Quenchkontrolle und ggf. -korrektur erfolgte anhand des externen Standards und des Kanalverhältnisses.

Weitere Berechnungen basierten auf derart hochgerechneten Werten.

Dem Sammelurin wurde nach seiner Volumenbestimmung ein Aliquot von 0.1 ml zur Messung entnommen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Plasmamessung (s.o.).

Der Rest des Urins wurde eingefroren und bis zur Analyse bei -18°C aufbewahrt.

3.3.2 HPLC-Methode

Gleiche Volumenanteile Plasma der Tiere einer Gruppe wurden pro Zeitpunkt miteinander vermischt. In einem Aliquot (je nach Radioaktivitätsgehalt 0.1 - 2.0 ml) wurde das Eiweiß gefällt (s. 1.7.2) und abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt, nochmals in 2 - 3 ml Aceton/ Methanol 75/25 v/v aufgenommen und zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde zur Trockene eingeeengt, in 0.15 ml 0.01 molarer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /Methanol 50/50 v/v aufgenommen, wiederum zentrifugiert (ca. 2000 g, 15 min) und anschließend auf die Säule gegeben.

Gleiche Volumenanteile Sammelurin der Tiere einer Gruppe wurden miteinander vermischt. Ein Aliquot (je nach Radioaktivitätsgehalt 0.05 - 0.35 ml) wurde zentrifugiert (ca. 2000 g, 15 min) und der Überstand direkt auf die Säule gegeben.

Die HPLC-Parameter entsprachen den in 1.7.2 beschriebenen.

4. Geräte und Reagentien

Leberperfusionsapparatur	Fa. W. Krannich, Göttingen
HPLC-Pumpen Model 510	Fa. Waters, Assc., Milford/USA
" Gradientengeber	" " "
" Säulen 16 mm	Fa. Knauer, Berlin
8 mm	" " "
4.6 mm	Fa. Bischoff, Leonberg
" -Füllmaterial RP 2 10 µm	Fa. Merck, Darmstadt
" RP 8 5 µm	" " "
" -Einspritzsystem	Fa. Bischoff, Leonberg
" -Spritzen	Hamilton AG, Bonaduz/ Schweiz
" -Fraktionensammler	
Modell 328	Fa. Isco, Lincoln/USA
" -Lösungsmittelfilter	
Millipore	Fa. Bischoff, Leonberg
Szintillationsflüssigkeit	
Atomlight	Fa. NEN, Boston/USA
Szintillationsmeßgefäße	
Plastik 20 ml	Fa. Packard, Warrentville/ USA
" 5 ml	Zinsser GmbH, Frankfurt
Glas 20 ml	Beckmann Inc., Irvine/USA
Waschlauge RBS 35-Konzentrat	Fa. C. Roth, Karlsruhe
NaCl p.a.	Fa. Merck, Darmstadt
KCl "	" " "
MgSO ₄ -6-hydrat p.a.	Riedel-De Haen AG, Seelze- Hannover
CaCl ₂ -2-hydrat "	" " "
KH ₂ PO ₄ "	Fa. Merck, Darmstadt
NaHCO ₃ "	Riedel-De Haen AG, Seelze- Hannover

Albumin aus Rinderserum		Fa. Serva, Heidelberg
Ampicillin		" " "
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	p.a.	Riedel-De Haen AG, Seelze-Hannover
Methanol	p.a.	Fa. Merck, Darmstadt
Aceton	"	" " "
Carbogen (O_2/CO_2 95/5 v/v)		Fa. Linde, Unterschleißheim
Phosphatpuffer pH 7:		
KH_2PO_4	1/15 mol/l p.a. (1)	Fa. Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	1/15 mol/l p.a. (2)	" " "
38.8 ml Lösung (1) +		
61.2 ml Lösung (2)		

5. Auswertung

5.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Werte wurden in % der applizierten Dosis angegeben. Die Angaben des Radioaktivitätsgehaltes im Plasma bezogen sich auf das gesamte Plasmavolumen (Ratte 31 ml/kg, Hund 48 ml/kg, Affe 45 ml/kg nach Dittmer, 1961).

Die Angaben des Radioaktivitätsgehaltes im Urin bezogen sich auf das gemessene Urinvolumen.

Die Auswertung der Konzentrationsmessungen im Plasma erfolgte mit Hilfe des FORTRAN-Programmes /TB/P, die Auswertung der Konzentrationsmessungen im Urin erfolgte mit Hilfe des FORTRAN-Programmes /TB/U. Beide Programme wurden im Hauptdepartment Pharmakokinetik erstellt.

5.2 Auswertung der HPL-Chromatogramme

Die HPL-Chromatogramme wurden mit Hilfe des Programms SZGR aus dem Forschungsrechenzentrum der Schering AG, Berlin, ausgewertet. Sie wurden in die Metabolitenzonen X, A-D und T, die Zone des unveränderten Wirkstoffs, Tergurid eingeteilt.

Die Radioaktivität dieser Zonen wurde integriert und zur insgesamt eluierten Radioaktivität des HPL-Chromatogramms in prozentualen Bezug gesetzt.

5.3 Statistische Auswertung

Aus den Einzelwerten einer Gruppe wurde das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit seiner Standardabweichung (S.A.) berechnet.

5.4 Auswertung der Massenspektren und der NMR-Spektren

Die Auswertung der Massenspektren erfolgte im Hauptdepartment Pharmakokinetik der Schering AG, Berlin, durch Herrn Dr. Krause. Die NMR-Spektren wurden im Department Spektrometrie durch Herrn Dr. Hoyer ausgewertet.

IV. ERGEBNISSE

1. Perfusion der isolierten Rattenleber

1.1 Bilanzierung der eingesetzten Dosis

Zunächst wurde zur Bilanzierung der eingesetzten Dosis die prozentuale Verteilung der Gesamtradioaktivität auf Perfusat, Leber, Galle und Spülflüssigkeiten der Einzelperfusionen (Tabelle 5) bestimmt.

Tabelle 5: Prozentuale Verteilung der eingesetzten Radioaktivität (RA) auf Perfusat, Leber, Galle und Spülflüssigkeiten (Sp.f.) bei 5 Leberperfusionen (LP) 90 min p.appl. (Angaben in % der eingesetzten RA - 2.0 ± 0.04 MBq)

	Per- fusat	Leber	Galle	Sp.f.1	Sp.f.2	Sp.f.3	Wieder- findungs- rate
LP 1	56.8	33.8	5.5	2.4	0.6	0.1	99.2
LP 2	55.7	30.3	8.9	1.3	n.b.*	0.1	96.8
LP 3	54.8	28.7	11.5	1.8	0.5	0.1	97.4
LP 4	61.8	30.9	5.3	1.6	0.4	0.1	100.1
LP 5	53.9	32.4	6.8	1.4	0.3	0.1	94.9
$\bar{x}$	56.6	31.2	7.6	1.7	0.5	0.1	97.7
S.A.	3.1	2.0	2.6	0.4	0.1	0.0	2.0

* nicht bestimmt

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, wurden nach 90 min Perfusion im Perfusat im Mittel der 5 Experimente 56.6 ± 3.1 % der eingesetzten Radioaktivität nachgewiesen, in der Leber 31.2 ± 2.0 % und in der Galle 7.6 ± 2.6 %.

Die Wiederfindungsrate betrug 97.7 ± 2.0 %.

1.2 Metabolitenmuster im Perfusat

Bei der Auswertung der HPL-Chromatogramme zum Zeitpunkt 0 min wurde ein Anteil an unverändertem Wirkstoff von ca. 76 % gefunden. Die Differenz von 24 % war z.T. methodisch bedingt, z.T. wurde sie durch die unvollständige radiochemische Reinheit der Ausgangssubstanz verursacht (s. Abb. 8a).

Abbildung 8b zeigt das HPL-Chromatogramm des Perfusatzgemischs zum Zeitpunkt 90 min.

Die relativen Anteile der Metabolitenzonen und des unveränderten Wirkstoffs an der Gesamtradioaktivität in Einzelperfusaten und Perfusatzgemisch sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Nach 90 min Perfusion war der Anteil an unverändertem Wirkstoff im Perfusatzgemisch auf 28.5 % gesunken.

Der prozentuale Anteil der Metabolitenzonen an der ^3H -Radioaktivität betrug 18.2 % (MZ X), 13.5 % (MZ A), 17.2 % (MZ B), 9.4 % (MZ C), 9.3 % (MZ D).

2. Metabolitenisolierung und -identifizierung

2.1 Isolierung und Reinigung der Metaboliten

Ausgangspunkt der Metabolitenisolierung war das Perfusatzgemisch, in dem sich 56.9 % der eingesetzten Radioaktivität befanden. Dieser Anteil entsprach 34.17 mg-Äquivalenten ^3H -Tergurid.

Den Verlauf der Isolierung und Identifizierung zeigt Abbildung 9.

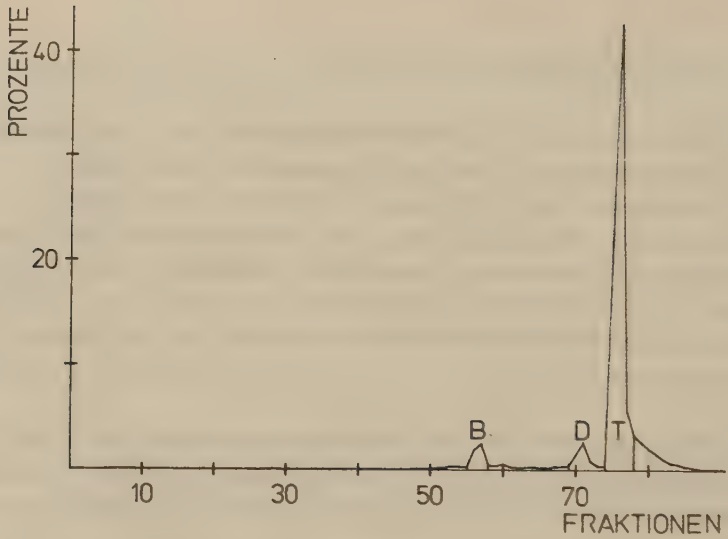


Abb. 8a

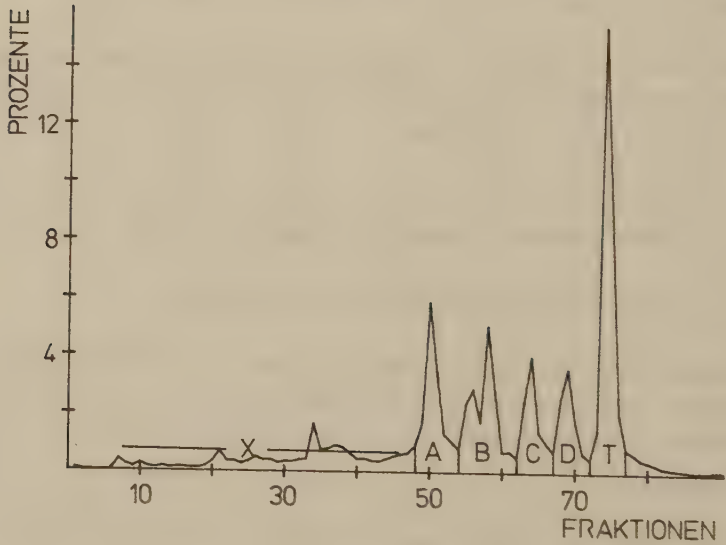


Abb. 8b

Abb. 8: HPL-Chromatogramm des Perfusatgemischs (8a: 0 min, 8b: 90 min) mit Einteilung in Metabolitenzonen X, A - D und unveränderten Wirkstoff (T)
HPLC-Parameter s. METHODIK 1.7.2

Tab. 6: Prozentuale Verteilung der Gesamtradioaktivität in den Perfusaten (90 min) und dem Pertusatgemisch auf Metabelitenzonen (MZ) und unveränderten Wirkstoff (T); Angaben in % der appl. Dosis in Klammern

	MZ X	%	MZ A	%	MZ B	%	MZ C	%	MZ D	%	T	% d.D.
Perf. 1	13.5	(7.7)	10.8	(6.1)	16.4	(9.3)	8.8	(5.0)	9.1	(5.2)	36.2	(20.6)
Perf. 2	19.1	(10.6)	13.3	(7.4)	19.8	(11.0)	8.5	(4.7)	9.2	(5.1)	26.2	(14.6)
Perf. 3	18.3	(10.0)	10.8	(5.9)	17.8	(9.8)	12.6	(6.9)	9.2	(5.0)	26.2	(14.4)
Perf. 4	20.3	(12.5)	11.2	(6.9)	17.3	(10.7)	8.8	(5.4)	9.1	(5.6)	29.1	(18.0)
Perf. 5	19.6	(10.6)	14.3	(7.7)	17.7	(9.5)	10.1	(5.4)	8.2	(4.4)	23.8	(12.8)
$\bar{x}$	18.2	(10.3)	12.1	(6.8)	17.8	(10.0)	9.8	(5.5)	9.0	(5.1)	28.3	(16.1)
S.A.	2.7	(1.7)	1.6	(0.8)	1.9	(1.1)	1.7	(0.8)	0.4	(0.4)	4.8	(3.2)
Perf. gemisch	18.2	(10.4)	13.5	(7.7)	17.2	(9.8)	9.4	(5.3)	9.3	(5.3)	28.5	(16.2)

PERFUSATGEMISCH

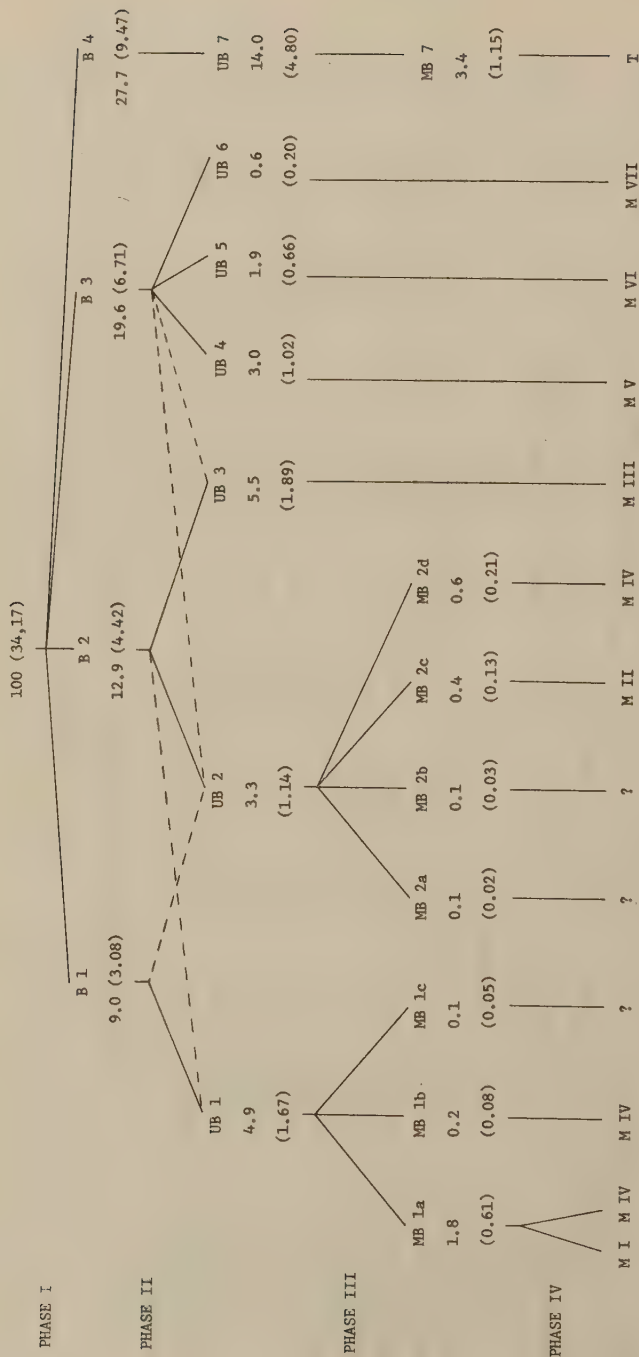


Abb. 9: Verlauf der Metabolitenisolierung mittels präparativer HPLC (Phase I: 16 mm-Säule, Phase II: 8 mm-Säule, Phase III: 4.6 mm-Säule) und ihrer Identifizierung (Phase IV: MS und NMR)
 B: Bereich, UB: Unterbereich, MB: Metabolitenbereich, T: Tergurid, ? : nicht aufgeklärte Strukturen
 Angaben in Prozent der eingesetzten Dosis (mg-Äquivalenten ³H-Tergurid)
 Gestrichelte Linien kennzeichnen die Nebenteile der Unterbereiche, Ausdruck für die ungenügende chromatographische Auftrennung in Phase I der Metabolitenisolierung

Nach der Auftrennung des Perfusatgemischs über eine 16 mm-Säule (Phase I) verteilte sich die eingesetzte Radioaktivität (100 % entspr. 34.17 mg-Äquiv.) wie folgt auf die Bereiche (B) 1 - 4: B 1: 9.0 % (3.08 mg-Äquiv.), B 2: 12.9 % (4.42 mg-Äquiv.), B 3: 19.6 % (6.71 mg-Äquiv.) und B 4: 27.7 % (9.47 mg-Äquiv.) (s. Tabelle 7).

Der Wiederfund an Radioaktivität nach Phase I der Metabolitenisolierung betrug 69.2 % (23.68 mg-Äquiv.).

Die weitere Auftrennung der Bereiche 1 - 4 über eine 8 mm-Säule (Phase II) ergab folgende Anteile für die Unterbereiche (UB) 1 - 7: UB 1: 4.9 % (1.67 mg-Äquiv.), UB 2: 3.3 % (1.14 mg-Äquiv.), UB 3: 5.5 % (1.89 mg-Äquiv.), UB 4: 3.0 % (1.02 mg-Äquiv.), UB 5: 1.9 % (0.66 mg-Äquiv.), UB 6: 0.6 % (0.20 mg-Äquiv.) und UB 7: 14.0 % (4.80 mg-Äquiv.) (s. Tabelle 8).

Der Wiederfund an Radioaktivität nach Phase II betrug 33.3 % (11.38 mg-Äquiv.) der eingesetzten Metabolitenmenge.

Nach Auftrennung der Unterbereiche 1, 2 und 7 über eine 4.6 mm-Säule (Phase III) wurden folgende Anteile für die Metabolitenbereiche (MB) 1a - c, 2a - d und 7 gemessen: MB 1a: 1.8 % (0.61 mg-Äquiv.), MB 1b: 0.2 % (0.08 mg-Äquiv.), MB 1c: 0.1 % (0.05 mg-Äquiv.), MB 2a: 0.1 % (0.02 mg-Äquiv.), MB 2b: 0.1 % (0.03 mg-Äquiv.), MB 2c: 0.4 % (0.13 mg-Äquiv.), MB 2d: 0.6 % (0.21 mg-Äquiv.) und MB 7: 3.4 % (1.15 mg-Äquiv.).

14.3 % der eingesetzten Radioaktivität (4.90 mg-Äquiv.) konnten schließlich zur Metabolitenidentifizierung eingesetzt werden.

Tab. 7: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität auf die Bereiche 1 - 4 nach Phase I der Metabolitenisolierung (Angaben in mg-Äquivalenten ^3H -Terpurid in Klammern)

	Bereich 1	Bereich 2	Bereich 3	Bereich 4
HPLC 1	(0.93)	18.1 %	19.5 %	(1.63)
HPLC 2	(0.36)	6.8 %	18.6 %	(2.30)
HPLC 3	(0.66)	13.0 %	16.8 %	(1.98)
HPLC 4	(0.67)	12.7 %	16.7 %	(1.77)
HPLC 5	(0.46)	10.9 %	16.9 %	(1.79)
$\bar{x}$	(0.62)	12.3 %	17.7 %	(1.89)
S.A.	(0.22)	4.1 %	1.3 %	(0.26)
Summe	(3.08)	-	-	(9.47)

	31.7 %	(1.63)	26.0 %	(1.63)	31.7 %
	43.5 %	(2.30)	28.1 %	(1.49)	43.5 %
	39.1 %	(1.98)	27.7 %	(1.40)	39.1 %
	33.7 %	(1.77)	27.1 %	(1.42)	33.7 %
	42.4 %	(1.79)	25.1 %	(1.06)	42.4 %
	38.1 %	(1.89)	26.8 %	(1.34)	38.1 %
	5.2 %	(0.26)	1.2 %	(0.17)	5.2 %
	-	(9.47)	-	(6.71)	-

Tab. 8: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität auf die Unterbereiche (UB) 1 - 7 nach Phase II der Metabolitenisolierung (Angaben in mg-Äquivalenten ³H-Tergurid in Klammern)

	UB 1	UB 2	UB 3	UB 4	UB 5	UB 6	UB 7
HPLC 1	47.9 % (1.34)	8.2 % (0.23)					
HPLC 2	9.3 % (0.33)	17.0 % (0.59)	39.9 % (1.40)				
HPLC 3		7.5 % (0.32)	11.4 % (0.49)	23.8 % (1.02)	15.3 % (0.66)	4.8 % (0.20)	90.3 % (4.80)
HPLC 4							(4.80)
Summe	(1.67)	(1.14)	(1.89)	(1.02)	(0.66)	(0.20)	(4.80)

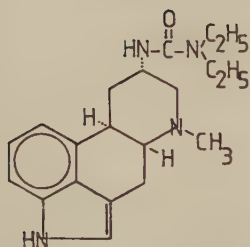
2.2 Identifizierung der Metaboliten

Nach Auswertung der Massenspektren und der NMR-Spektren wurden 7 Metaboliten aus den folgenden Unterbereichen bzw. Metabolitenbereichen identifiziert (s. Abbildung 9).

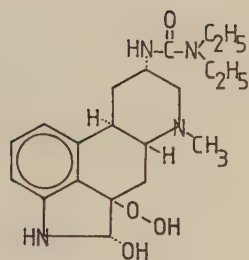
Unterbereich 3 enthielt ausschließlich M III, Unterbereich 4 M V, Unterbereich 5 M VI, Unterbereich 6 M VII und Unterbereich 7 unveränderten Wirkstoff. Unterbereich 1 und 2 beinhalten Metabolitengemische, was ihre weitere Auftrennung nötig machte. Die daraus hervorgegangenen Metabolitenbereiche enthielten folgende Metaboliten: Metabolitenbereich 2c M II, Metabolitenbereich 1b und 2d M IV. Metabolitenbereich 1a beinhaltet ein Gemisch aus zwei Metaboliten, die als M I und M IV identifiziert werden konnten.

Die Interpretation der Daten aus der Massenspektrometrie und der ^1H -NMR-Spektroskopie sprachen für die in Abbildung 10 wiedergegebenen Strukturen (die nachfolgenden Bezeichnungen entsprechen nicht der IUPAC-Nomenklatur):

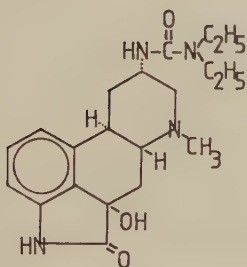
Tergurid	1,1-diethyl-3-(6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff
M I	1,1-diethyl-3-(2 α -hydroxy-3 β -hydroperoxy-2,3-dihydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff
M II	1,1-diethyl-3-(2-keto-3 β -hydroxy-2,3-dihydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff
M III	1,1-diethyl-3-(2-keto-3 α -hydroxy-2,3-dihydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff
M IV	1,1-diethyl-3-(2 α -hydroxy-2,3-peroxy-2,3-dihydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff



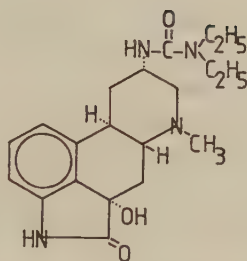
TERGURID



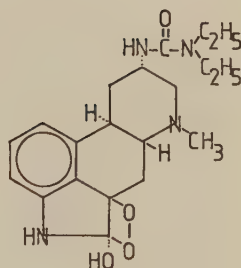
MI



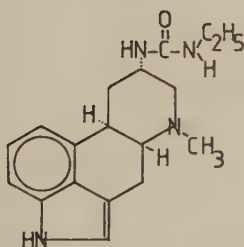
MII



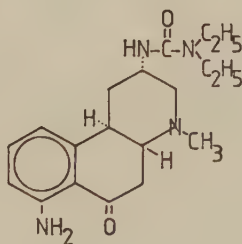
MIII



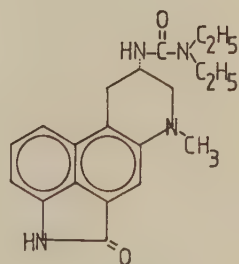
MIV



MV



MVI



MVII

Abb. 10: Strukturformeln von Tergurid und 7 seiner Metaboliten

M V	1-ethyl-3-(6-methyl-8 α -ergolinyl)-harstoff
M VI	1,1-diethyl-3-(1,2,3,4,4a,5,6,10b-octahydro-4-methyl-6-keto-7-amino-2 α -benzo-IfI-chinolino)-harnstoff
M VII	1,1-diethyl-3-(2-keto-2,3-dihydro-3,4,5,10-tetradehydro-6-methyl-8 α -ergolinyl)-harnstoff

2.3 Zuordnung der Metaboliten zum Metabolitenmuster

Mit der zur Verfügung stehenden analytischen HPLC-Methode war eine exakte chromatographische Auftrennung der Metaboliten nicht zu erreichen. Um eine Zuordnung der bekannten Strukturen zu den HPL-Chromatogrammen aus den in vitro und in vivo Versuchen zu ermöglichen, wurden diese in Metabolitenzonen (MZ) eingeteilt, die teilweise mehrere Metaboliten mit nahe beieinanderliegenden Retentionszeiten enthielten.

In Tabelle 9 sind die Retentionszeiten der identifizierten Metaboliten und des unveränderten Wirkstoffs im chromatographischen System und ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Metabolitenzonen wiedergegeben.

Abb. 11 zeigt die Lage von Tergurid und seinen Metaboliten M I - M VII im analytischen HPLC-System.

Tab. 9: Retentionszeiten von M I - M VII und unverändertem Wirkstoff im analytischen chromatographischen System und ihre Zugehörigkeit zu den Metabolitenzonen

	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	Tergurid
Retentionszeit in min	15.3	17.1	17.6	17.7	19.4	20.6	21.2	22.7
Metabolitenzone	MZA	MZB			MZC	MZD		T

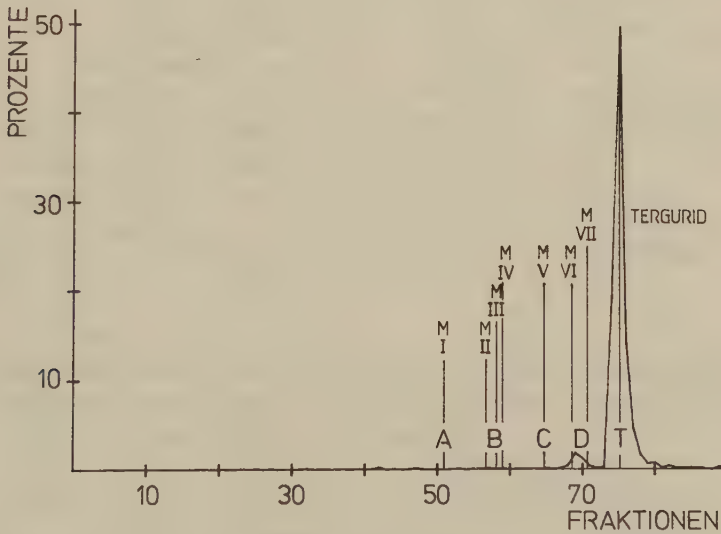


Abb. 11: Position von Tergurid und seinen Metaboliten M I - M VII im HPL-Chromatogramm (schematisch)

3. Studien am Ganztier

3.1 Studien an der Ratte

3.1.1 Ergebnisse aus der Plasmaanalytik

3.1.1.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 für beide Applikationsarten wiedergegeben.

Tab. 10: Gehalt an Radioaktivität im gesamten Plasmavolumen der Ratte nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von 0.25 mg/kg (entspr. 13 MBq/kg) ³H-Tergurid (Angaben in % der applizierten Dosis)

Zeit p.appl.	i.v.			i.g.		
	Tier- grup- pe 1	Tier- grup- pe 2	$\bar{x}$	Tier- grup- pe 1	Tier- grup- pe 2	$\bar{x}$
0.5 h	2.10	2.01	2.06	0.30	0.22	0.26
3 h	0.40	0.43	0.42	0.34	0.28	0.31
8 h	0.15	0.17	0.16	0.14	0.14	0.14

* (intragastraler)

Der Plasmaspiegel von Tergurid und seinen Metaboliten sank nach i.v.-Applikation von 2.06 % der applizierten Dosis (0.5 h) über 0.42 % (3 h) auf 0.16 % (8 h) ab.

Nach i.g.-Applikation wurden Werte von 0.26 % (0.5 h), 0.31 % (3 h) und 0.14 % (8 h) gemessen.

3.1.1.2 Metabolitenmuster im Plasma

Die Abbildungen 12a bzw. 13a zeigen HPL-Chromatogramme von Mischplasma der Ratte 3 h nach Applikation (i.v. bzw. i.g.), die Abbildungen 12b bzw. 13b den zeitlichen Verlauf der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen an der insgesamt eluierten Radioaktivität.

Der zeitliche Verlauf der Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtradioaktivität im Plasma ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Nach i.v. und i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid waren die Metabolitenmuster im Plasma sehr ähnlich.

Der Anteil an unverändertem Wirkstoff nahm im HPL-Chromatogramm nach i.v.-Applikation von 70.4 % (0.5 h) über 28.1 % (3 h) auf 20.3 % (8 h) deutlich ab, nach i.g.-Applikation war die Anfangskonzentration niedriger (58.0 % nach 0.5 h), die Werte zwischen 3 und 8 h waren annähernd konstant (25.7 und 30.7 %). Als Hauptmetabolit trat M V aus Metabolitenzone C in Erscheinung. Sein Anteil an der ^3H -Radioaktivität lag bei i.v.-Applikation nach 0.5 h bei 8.0 % und stieg auf 33.0 % (3 h) und 44.1 % (8 h). Bei i.g.-Applikation betrug er nach 0.5 h 16.6 % und blieb zwischen 3 und 8 h auf dem gleichen Niveau (37.4 und 36.5 %).

Metabolitenzone A, B und D waren anteilmäßig deutlich schwächer vertreten (< 10 %). Der zeitliche Verlauf ihrer Anteile ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Die unbekannten Metaboliten aus Metabolitenzone X stiegen nach i.v. (i.g.)-Applikation von 6.0 % (7.7 %) 0.5 h p.appl. auf 14.9 % (12.6 %) 3 h p.appl., um dieses Niveau beizubehalten (14.7 % (11.3 %) 8 h p.appl.).

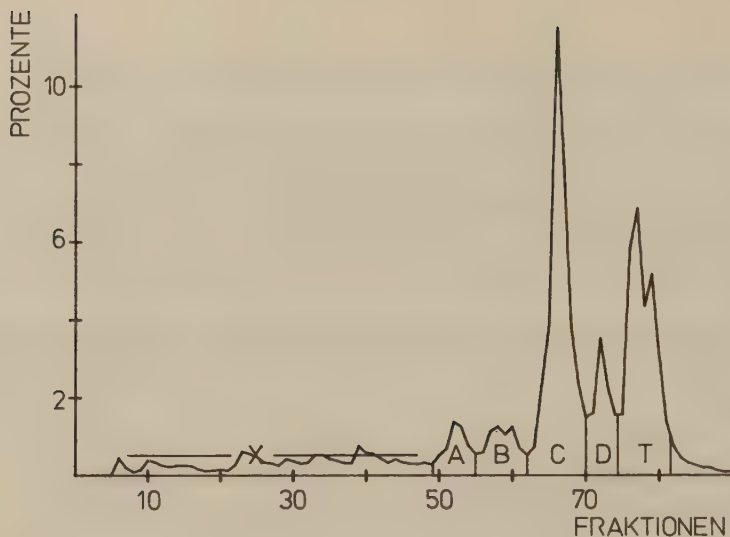


Abb. 12a: HPL-Chromatogramm von 3h-Mischplasma der Ratte mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

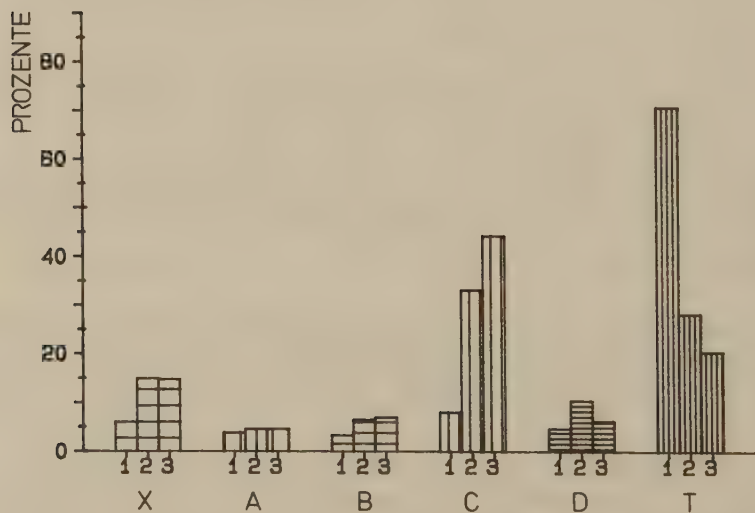


Abb. 12b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma der Ratte 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

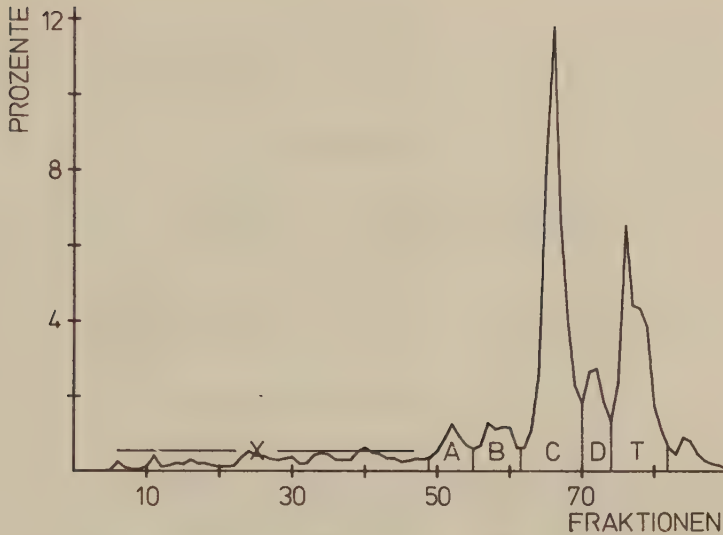


Abb. 13a: HPL-Chromatogramm von 3h-Mischplasma der Ratte mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

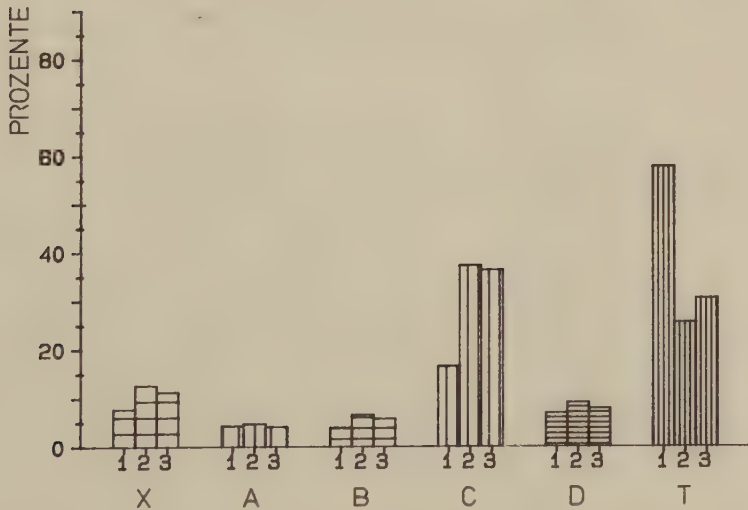


Abb. 13b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma der Ratte 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

Tab. 11: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma der Ratte auf Metabolitenzonen und unveränderten Wirkstoff nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von ³H-Tergurid (Angaben in % d. appl. Dosis in Klammern)

Zeit		MZ X	MZ A	MZ B	MZ C	MZ D	T						
p.appl.													
i.v.	0.5 h	6.0	(0.12)	3.8	(0.08)	3.3	(0.07)	8.0	(0.16)	4.7	(0.10)	70.4	(1.45)
	3 h	14.9	(0.06)	4.6	(0.02)	6.5	(0.03)	33.0	(0.14)	10.4	(0.04)	28.1	(0.12)
	8 h	14.7	(0.02)	4.6	(0.01)	7.0	(0.01)	44.1	(0.07)	6.3	(0.01)	20.3	(0.03)
i.g.	0.5 h	7.7	(0.02)	4.3	(0.01)	3.9	(0.01)	16.6	(0.04)	7.0	(0.02)	58.0	(0.15)
	3 h	12.6	(0.04)	4.7	(0.01)	6.6	(0.02)	37.4	(0.12)	9.1	(0.03)	25.7	(0.08)
	8 h	11.3	(0.02)	4.1	(0.01)	5.8	(0.01)	36.5	(0.05)	7.9	(0.01)	30.7	(0.04)

* (intrastraler)

3.1.2 Ergebnisse aus der Urinanalytik

3.1.2.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind für alle Tierarten und Applikationsformen in Tabelle 12 wiedergegeben.

Die Ratte schied im 24 h-Urin 17.25 (i.v.) bzw. 11.19 % der applizierten Dosis (i.g.) aus.

3.1.2.2 Metabolitenmuster im Urin

Abbildung 14a zeigt das HPL-Chromatogramm von 24 h-Mischurin der Ratte nach i.v.-Applikation, Abbildung 14b einen Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen im Urin nach i.v. und i.g.-Applikation.

Die Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtradioaktivität im Urin sind für alle Tierarten und Applikationsformen Tabelle 13 zu entnehmen.

Die HPL-Chromatogramme des Urins ließen nach i.v. und i.g.-Applikation keine größeren Unterschiede erkennen. Ein geringer Teil unveränderter Wirkstoff wurde mit dem Urin ausgeschieden (ca. 0.5 % der Dosis).

Als Hauptmetabolit trat wiederum M V aus Metabolitenzone C in Erscheinung, der im 24 h-Mischurin einen Anteil von 21.7 bzw. 20.4 % an der ^3H -Aktivität hatte. Deutlich vertreten war auch Metabolitenzone B (14.2 bzw. 14.4 %), deren Anteil im Plasma unter 10 % gelegen hatte. Die Anteile von Zone A und D, die nur schwach (ca. 5 %) vertreten waren, sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Der Hauptanteil mit 51.7 bzw. 48.5 % der Gesamtradioaktivität lag bei Metabolitenzone X mit den unbekannten Metaboliten.

Tab. 12: Ausscheidung der ^3H -Gesamtradioaktivität im 24 h-Urin von Ratte, Hund und Affe nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von ^3H -Tergurid (Angaben in % der appl. Dosis)

	i.v.	i.g.	i.v.	i.g.	i.v.	i.g.
Ratte 1	23.52	16.71	Hund 1	36.81	Affe 1	48.45
Ratte 2	10.98	5.66	Hund 2	32.33	Affe 2	30.35
			Hund 3	39.68	Affe 3	50.11
$\bar{x}$	17.25	11.19	$\bar{x}$	36.27	$\bar{x}$	42.97
S.A.			S.A.	3.70	S.A.	10.96
						1.50

* (intragastroler)

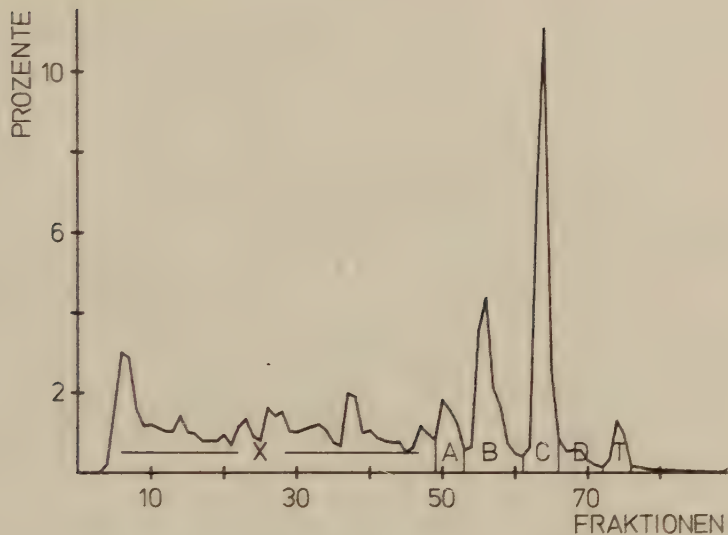


Abb. 14a: HPL-Chromatogramm von 24 h-Mischurin der Ratte mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

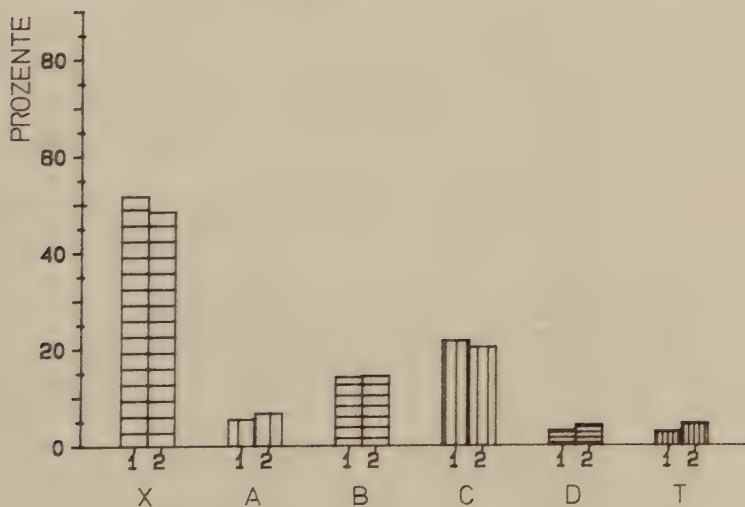


Abb. 14b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im 24 h-Mischurin der Ratte nach i.v. (1) - bzw. i.g. (2) -Applikation von ^3H -Tergurid

Tab. 13: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität im 24 h-Mischurin von Ratte, Hund und Affe auf Metabolitenzonen und unveränderten Wirkstoff nach i.v.- bzw. i.g.*-Applikation von ^3H -Terpurid (Angaben in % d. appl. Dosis in Klammern)

	MZ X	MZ A	MZ B	MZ C	MZ D	T							
Ratte	i.v.	51.7	(8.92)	5.5	(0.95)	14.2	(2.45)	21.7	(3.74)	3.1	(0.53)	2.9	(0.50)
	i.g.	48.5	(5.43)	6.7	(0.75)	14.4	(1.61)	20.4	(2.28)	4.3	(0.48)	4.6	(0.51)
Hund	i.v.	55.8	(20.24)	21.3	(7.73)	10.1	(3.66)	4.4	(1.60)	2.6	(0.94)	3.6	(1.31)
	i.g.	60.3	(13.97)	17.0	(3.94)	10.8	(2.50)	4.9	(1.13)	2.0	(0.46)	2.5	(0.58)
Affe	i.v.	88.6	(38.07)	3.8	(1.63)	3.3	(1.42)	2.1	(0.90)	0.8	(0.34)	0.7	(0.30)
	i.g.	83.2	(31.72)	5.8	(2.21)	5.8	(2.21)	2.5	(0.95)	1.0	(0.38)	0.7	(0.27)

* (intrastraler)

3.2 Studien am Hund

3.2.1 Ergebnisse aus der Plasmaanalytik

3.2.1.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 für beide Applikationsarten wiedergegeben.

Der Plasmaspiegel von Tergurid und seinen Metaboliten sank nach i.v.-Applikation von 5.56 ± 0.89 % der applizierten Dosis (0.5 h) über 1.39 ± 0.22 % (3 h) auf 0.65 ± 0.01 % (8 h) ab.

Nach i.g.-Applikation wurden Werte von 2.02 ± 0.55 % (0.5 h), 1.08 ± 0.16 % (3 h) und 0.59 ± 0.06 % (8 h) gemessen.

3.2.1.2 Metabolitenmuster im Plasma

Die Abbildungen 15a bzw. 15b zeigen HPL-Chromatogramme von Mischplasma des Hundes 3 h nach Applikation (i.v. bzw. i.g.). Der zeitliche Verlauf der Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtaktivität im Plasma ist Tabelle 15 zu entnehmen.

Die Metabolitenmuster im Plasma waren nach i.v. und i.g.-Applikation sehr ähnlich.

0.5 h p.appl. bestand der überwiegende Anteil der Radioaktivität aus unverändertem Wirkstoff (73.3 bzw. 78.0 %). Er nahm sowohl nach i.v. als auch nach i.g.-Applikation sehr rasch ab (über 10.3 % (3 h) auf 1.8 % (8 h), i.v. bzw. über 24.9 % (3 h) auf 3.5 % (8 h), i.g.).

Tab. 14: Gehalt an Radioaktivität im gesamten Plasmavolumen des Hundes nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von 0.1 mg/kg (entspr. 1.4 bzw. 4.6 MBq/kg) ^3H -Terpurid (Angaben in % der appl. Dosis)

Zeit	Hund 1	Hund 2	Hund 3	$\bar{x}$	S.A.	Hund 1	Hund 2	Hund 3	$\bar{x}$	S.A.
0.5 h	5.87	4.55	6.25	5.56	0.89	1.51	1.94	2.61	2.02	0.55
3 h	1.55	1.14	1.47	1.39	0.22	1.21	0.91	1.13	1.08	0.16
8 h	0.66	0.65	0.65	0.65	0.01	0.65	0.56	0.55	0.59	0.06

* intragastraler

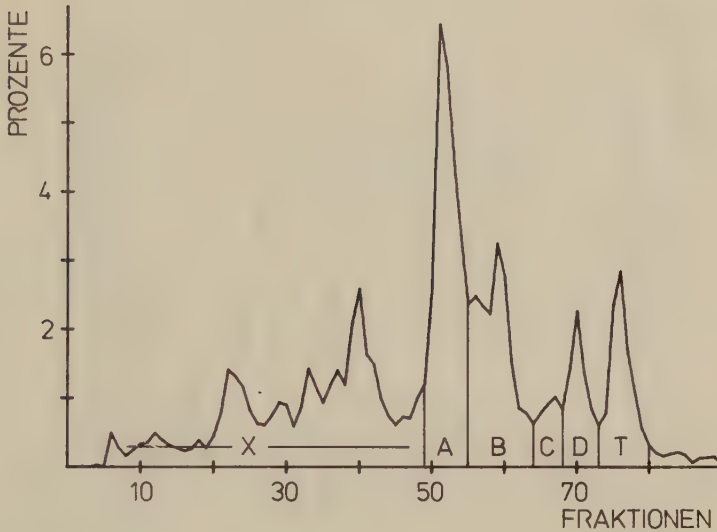


Abb. 15a: HPL-Chromatogramm von 3 h-Mischplasma des Hundes mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergrud

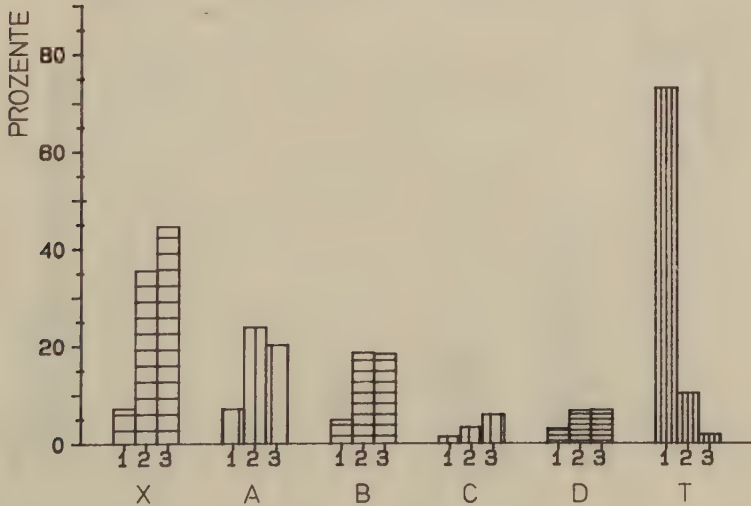


Abb. 15b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Hundes 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergrud

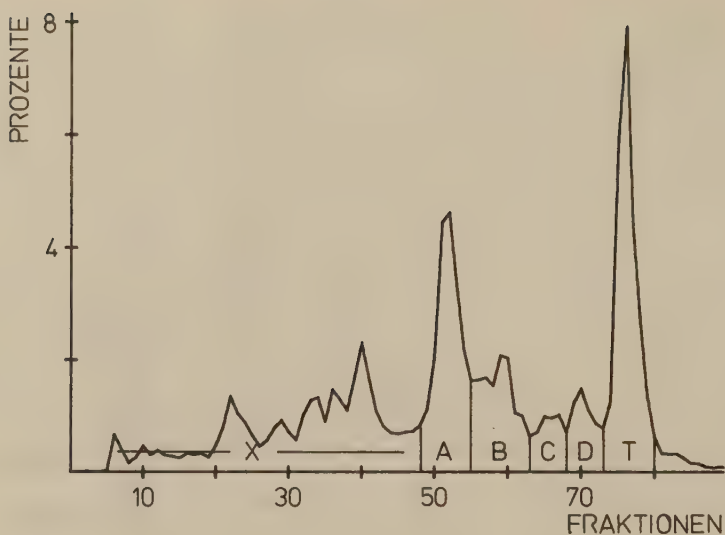


Abb. 16a: HPL-Chromatogramm von 3 h-Mischplasma des Hundes mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

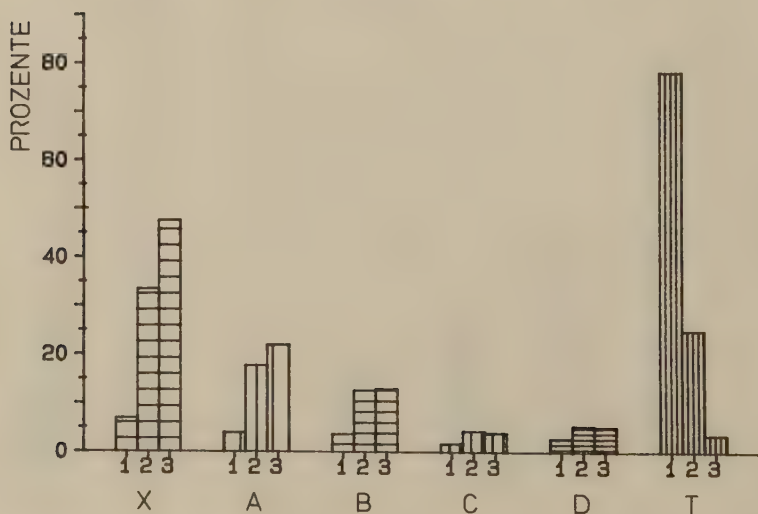


Abb. 16b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzone X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Hundes 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

Tab. 15: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Hundes auf Metabolitenzonen und unveränderten Wirkstoff nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von ³H-Tergurid (Angaben in % d. appl. Dosis in Klammern)

	Zeit	MZ X	MZ A	MZ B	MZ C	MZ D	T
	p.appl.						
	0.5 h	7.2	(0.40)	7.1	(0.39)	4.9	(0.27) 1.4 (0.08) 3.0 (0.17) 73.3 (4.08)
i.v.	3 h	35.5	(0.49)	23.9	(0.33)	18.6	(0.26) 3.3 (0.05) 6.7 (0.09) 10.3 (0.14)
	8 h	44.6	(0.29)	20.2	(0.13)	18.4	(0.12) 5.9 (0.04) 6.9 (0.04) 1.8 (0.01)
	0.5 h	6.9	(0.14)	3.9	(0.08)	3.7	(0.07) 1.7 (0.03) 2.8 (0.06) 78.0 (1.58)
i.g.	3 h	33.4	(0.36)	17.7	(0.19)	12.6	(0.14) 4.3 (0.05) 5.4 (0.06) 24.9 (0.27)
	8 h	47.5	(0.28)	21.9	(0.13)	12.9	(0.08) 3.9 (0.02) 5.2 (0.03) 3.5 (0.02)

* (intragastroler)

Hauptmetabolit war M I aus Metabolitenzone A. Sein relativer Anteil stieg nach i.v.-Applikation von 7.1 % (0.5 h) auf 23.9 % (3 h) und sank 8 h p.appl. leicht ab (20.2 %). Bei i.g.-Applikation betrug er nach 0.5 h 3.9 % und stieg auf 17.7 % (3 h) und 21.9 % (8 h) an.

Deutlich vertreten war auch Metabolitenzone B, deren Anteil von 4.9 bzw. 3.7 % (0.5 h) auf 18.6 bzw. 12.6 % (3 h) anstieg, um auf diesem Niveau zu verbleiben (18.4 bzw. 12.9 % 8 h p.appl.).

Die Metabolitenzonen C und D waren anteilmäßig schwach vertreten (< 10 %, s. Tab. IV/11).

Die polareren Abbauprodukte aus Metabolitenzone X waren stark vertreten. Ihr relativer Anteil stieg nach i.v. (i.g.)-Applikation von 7.2 (6.9) % 0.5 h p.appl. über 35.5 (33.4) % 3 h p.appl. auf 44.6 (47.5) % 8 h p.appl. an.

3.2.2 Ergebnisse aus der Urinanalytik

3.2.2.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 12 (s. 3.1.2.1) ersichtlich.

Der Hund schied im 24 h-Urin 36.27 ± 3.70 % der applizierten Dosis nach i.v.-Applikation und 23.16 ± 1.13 % nach i.g.-Applikation aus.

3.2.2.2 Metabolitenmuster im Urin

Abbildung 17a zeigt das HPL-Chromatogramm vom 24 h-Mischurin des Hundes nach i.v.-Applikation, Abbildung 17b einen Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen im Urin nach i.v. und i.g.-Applikation.

Die Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtradioaktivität im Urin sind Tabelle 13 (s. 3.1.2.2) zu entnehmen. Die HPL-Chromatogramme des Urins ließen nach i.v. und i.g.-Applikation keine größeren Unterschiede erkennen. Es wurde ein geringer Teil an unverändertem Wirkstoff mit dem Urin ausgeschieden (1.31 bzw. 0.58 % der Dosis).

Auch hier vertrat M I aus Metabolitenzone A mit 21.3 bzw. 17.0 % den größten Anteil an bekannten Metaboliten. Deutlich repräsentiert war auch Metabolitenzone B (10.1 bzw. 10.8 %).

Die Metabolitenzonen C und D waren sehr schwach vertreten (< 5 %, s. Tab. 13).

Der Hauptanteil an der Gesamtaktivität im Urin vertrat Metabolitenzone X mit 55.8 bzw. 60.3 %.

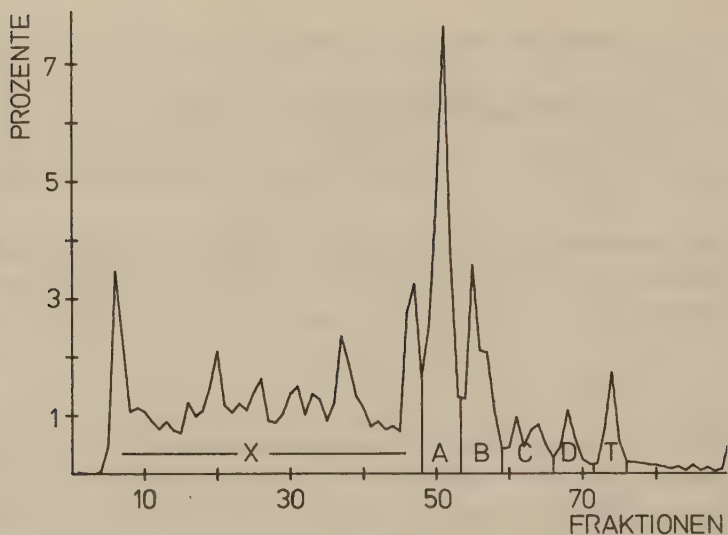


Abb. 17a: HPL-Chromatogramm von 24 h-Mischurin des Hundes mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

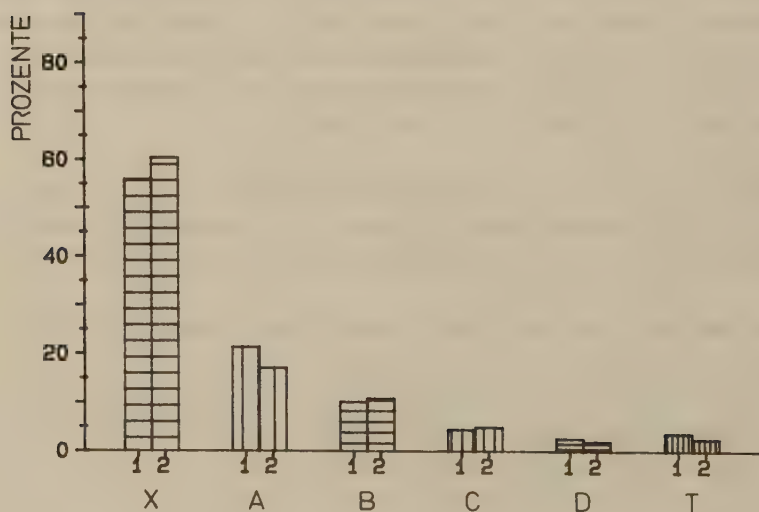


Abb. 17b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im 24 h-Mischurin des Hundes nach i.v. (1)- bzw. i.g. (2)-Applikation von ^3H -Tergurid

3.3 Studien am Affen

3.3.1 Ergebnisse aus der Plasmaanalytik

3.3.1.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 für beide Applikationsarten wiedergegeben.

Der Plasmaspiegel von Tergurid und seinen Metaboliten sank nach i.v.-Applikation von 4.99 ± 0.39 % der applizierten Dosis (0.5 h) über 1.16 ± 0.12 % (3 h) auf 0.56 ± 0.07 % (8 h) ab.

Nach i.g.-Applikation wurden Werte von 0.28 ± 0.15 % (0.5 h), 1.56 ± 0.27 % (3 h) und 0.56 ± 0.09 % (8 h) gemessen.

3.3.1.2 Metabolitenmuster im Plasma

Die Abbildungen 18a bzw. 19a zeigen HPL-Chromatogramme von Mischplasma des Affen 3 h nach Applikation (i.v. bzw. i.g.), die Abbildungen 18b bzw. 19b den zeitlichen Verlauf der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen an der insgesamt eluierten Radioaktivität.

Der zeitliche Verlauf der Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtradioaktivität im Plasma ist Tabelle 17 zu entnehmen. Die Chromatogramme der 8 h p.appl. gewonnenen Proben waren nicht auszuwerten, da die Gesamtradioaktivität zu gering war.

Nach i.v. und i.g.-Applikation waren die Metabolitenmuster im Plasma einander sehr ähnlich.

Tab. 16: Gehalt an Radioaktivität im gesamten Plasmavolumen des Affen nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von 0.1 mg/kg (entspr. 1.1 bzw. 3.2 MBq/kg) ³H-Tergurid (Angaben in % der appl. Dosis)

Zeit p.appl.	i.v.			i.g.		
	Affe 1	Affe 2	Affe 3	$\bar{x}$	S.A.	Affe 1 Affe 2 Affe 3 $\bar{x}$ S.A.
0.5 h	4.64	5.41	4.92	4.99	0.39	0.45 0.20 0.19 0.28 0.15
3 h	1.18	1.27	1.04	1.16	0.12	1.39 1.41 1.87 1.56 0.27
8 h	0.58	0.62	0.49	0.56	0.07	0.67 0.50 0.52 0.56 0.09

* (intraogastral)

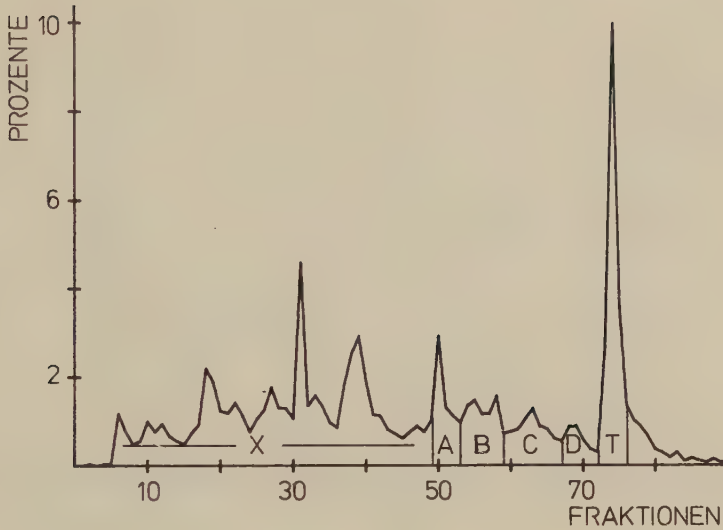


Abb. 18a: HPL-Chromatogramm von 3 h-Mischplasma des Affen mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

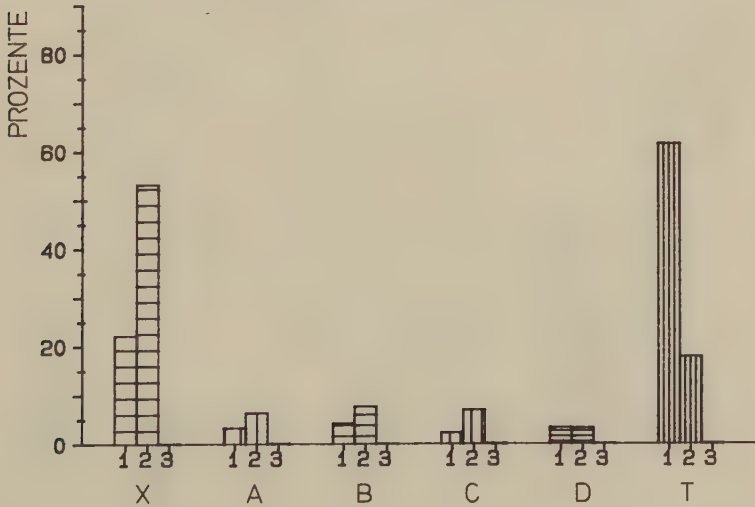


Abb. 18b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Affen 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

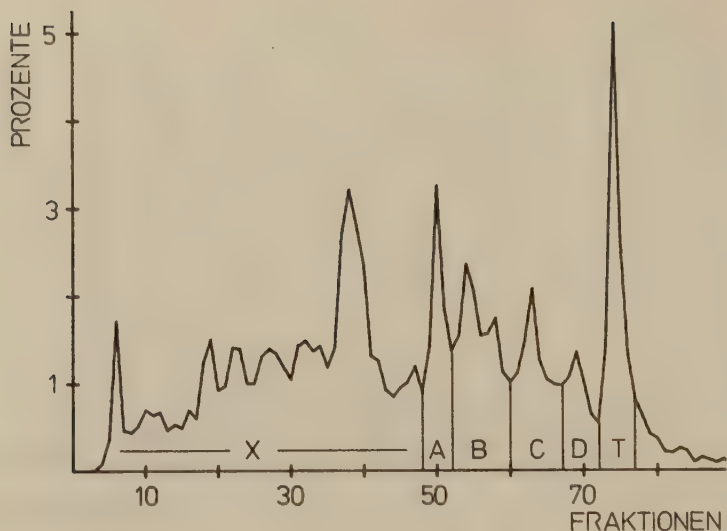


Abb. 19a: HPL-Chromatogramm von 3 h-Mischplasma des Affen mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

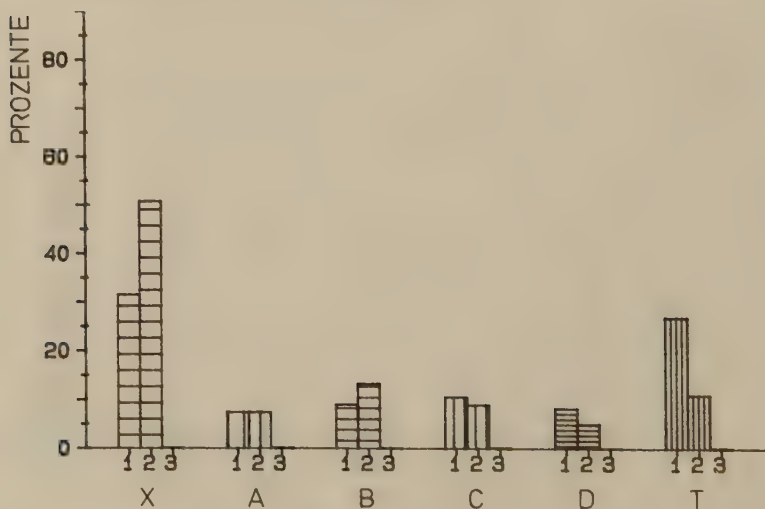


Abb. 19b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Affen 0.5 h (1), 3 h (2) und 8 h (3) nach i.g.-Applikation von ^3H -Tergurid

Tab. 17: Prozentuale Verteilung der insgesamt eluierten Radioaktivität im Mischplasma des Affen auf Metabolitenzonen und unveränderten Wirkstoff nach i.v. bzw. i.g.*-Applikation von ³H-Tergurid (Angaben in % d.appl. Dosis in Klammern)

Zeit p.appl.		MZ X	MZ A	MZ B	MZ C	MZ D	T						
i.v.	0.5 h	22.2	(1.11)	3.3	(0.16)	4.3	(0.21)	2.3	(0.11)	3.4	(0.17)	61.8	(3.08)
	3 h	53.2	(0.62)	6.4	(0.07)	7.7	(0.09)	7.0	(0.08)	3.3	(0.04)	17.9	(0.21)
i.g.	0.5 h	31.5	(0.09)	7.4	(0.02)	9.0	(0.03)	10.5	(0.03)	8.2	(0.02)	26.7	(0.07)
	3 h	50.7	(0.79)	7.4	(0.12)	13.2	(0.21)	8.9	(0.14)	5.0	(0.08)	10.9	(0.17)

* (intrastraler)

Der Anteil an unverändertem Wirkstoff nahm nach i.v.-Applikation von 61.8 % (0.5 h) auf 17.9 % (3 h) deutlich ab. Nach i.g.-Applikation war der Wert 0.5 h p.appl. mit 26.7 % relativ gering und erreichte 3 h p.appl. mit 10.9 % einen noch niedrigeren Punkt.

Ein Hauptmetabolit war nicht zu charakterisieren, da die Metabolitenmuster auch zahlreiche Abbauprodukte unbekannter Struktur erkennen ließen.

M I aus Metabolitenzone A trat deutlich hervor: sein Anteil stieg nach i.v.-Applikation von 3.3 % (0.5 h) auf 6.4 % (3 h) und zeigte nach i.g.-Applikation 0.5 und 3 h p.appl. einen Wert von 7.4 %.

Die Metabolitenzonen B und C waren insbesondere nach i.g.-Applikation gut vertreten: der Anteil von Zone B betrug hier 9.0 % (0.5 h) und 13.2 % (3 h), derjenige von Zone C 10.5 % (0.5 h) und 8.9 % (3 h).

Metabolitenzone D erreichte nur 0.5 h nach i.g.-Applikation einen Wert von 8.2 % und stellte sich zu den anderen Zeitpunkten nur wenig dar (< 5 %, s. Tabelle 17).

Der Hauptanteil der Gesamtradioaktivität bestand aus den unbekannten Metaboliten aus Metabolitenzone X. Der Anteil dieser Zone stieg nach i.v.-Applikation von 22.2 % (0.5 h) auf 53.2 % (3 h) und nach i.g.-Applikation von 31.5 % (0.5 h) auf 50.7 % (3 h).

3.3.2 Ergebnisse aus der Urinanalytik

3.3.2.1 Bestimmung der Gesamtradioaktivität

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 12 (s. 3.1.2.1) ersichtlich. Der Affe schied im 24 h-Urin 42.97 ± 10.96 % der applizierten Dosis nach i.v.-Applikation und 38.13 ± 1.50 % nach i.g.-Applikation aus.

3.3.2.2 Metabolitenmuster im Urin

Abbildung 20a zeigt das HPL-Chromatogramm von 24 h-Mischurin des Affen nach i.v.-Applikation, Abbildung 20b einen Vergleich der prozentualen Anteile der Metabolitenzonen im Urin nach i.v. und i.g.-Applikation.

Die Anteile der Metabolitenzonen an der Gesamtradioaktivität im Urin sind Tabelle 13 (s. 3.1.2.2) zu entnehmen. Die HPL-Chromatogramme des Urins waren einander bei beiden Applikationsarten sehr ähnlich.

Unveränderter Wirkstoff wurde nur zu einem Anteil von ca. 0.3 % d. Dosis im Urin ausgeschieden.

Wie im Plasma war auch im Urin M I aus Metabolitenzone A gut zu erkennen. Sein Anteil an der Gesamtradioaktivität betrug jedoch nur 3.8 bzw. 5.8 %.

Die Metabolitenzonen B, C und D waren ebenfalls sehr schwach repräsentiert. Nur Zone B hatte mit 5.8 % nach i.g.-Applikation einen Anteil von über 5 % (s. Tabelle 13).

Lediglich 10.7 bzw. 15.8 % der ^3H -Aktivität im Urin wurden von Metabolitenzonen mit bekannten Verbindungen vertreten, 88.6 bzw. 83.2 % entfielen auf Metabolitenzone X mit unbekannten, polareren Abbauprodukten von Tergurid.

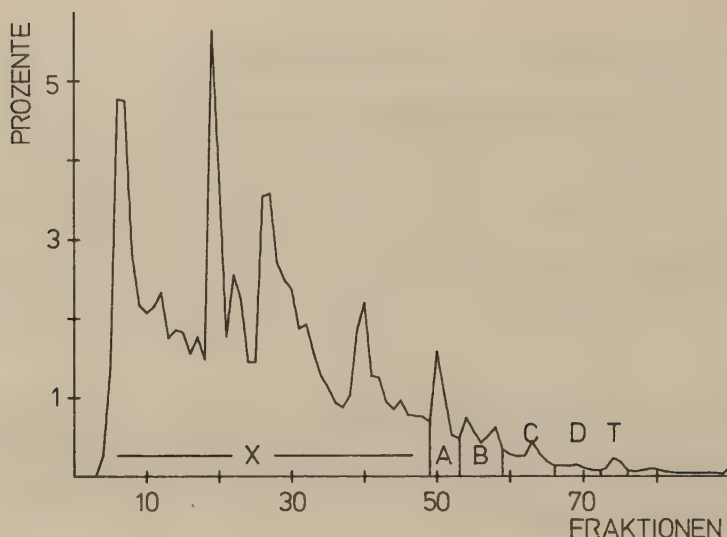


Abb. 20a: HPL-Chromatogramm von 24 h-Mischurin des Affen mit Einteilung in die MZ X, A - D und T nach i.v.-Applikation von ^3H -Tergurid

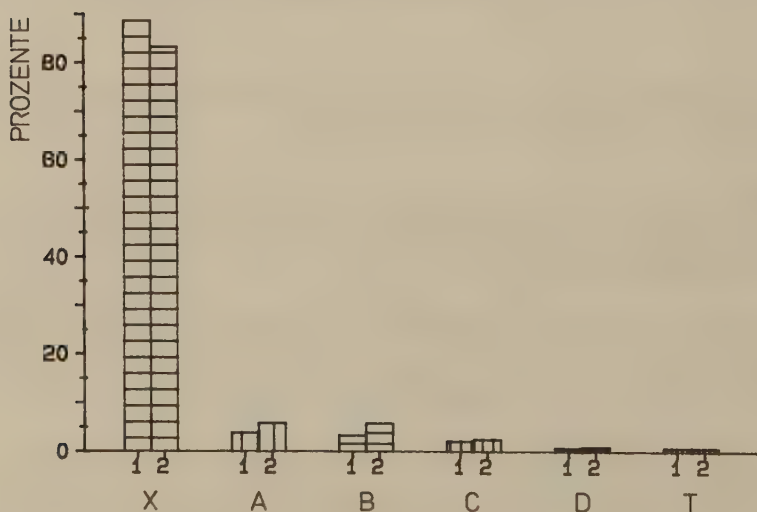


Abb. 20b: Vergleich der prozentualen Anteile der Metaboliten-zonen X, A - D und T an der insgesamt eluierten Radioaktivität im 24 h-Mischurin des Affen nach i.v.(1)- bzw. i.g.(2)-Applikation von ^3H -Tergurid

V. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Biotransformation von Tergurid am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber zu studieren und die Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf in vivo Verhältnisse zu überprüfen.

Aus dem Perfusionsmedium konnten nach mehreren Phasen der Isolierung sieben Metaboliten spektroskopisch identifiziert werden. Im Anschluß daran erfolgte ihre Zuordnung zu HPL-Chromatogrammen von biologischen Proben aus Ganztierversuchen an Ratte, Hund und Affe.

1. Perfusion der isolierten Rattenleber

Der Einsatz des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber zur "Metabolitenproduktion" von Xenobiotica wurde in der Literatur schon häufig beschrieben (v. Bahr et al., 1970; Bickel u. Minder, 1970; Oshino u. Chance, 1977; Siddik et al., 1979 a; Toda u. Oshino, 1981). Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Modell entsprach weitgehend den Angaben von Meijer et al. (1981). Es handelte sich um ein geschlossenes System, das zum Studium von Biotransformationsprozessen besonders gut geeignet ist, da mit dieser Technik auch Sekundärreaktionen verfolgt werden können, was in offenen Systemen nicht möglich ist. Ein weiterer Vorteil liegt in den geringen Perfusionsvolumina, die eine langwierige Aufkonzentrierung der Metaboliten vor ihrer Reinigung unnötig machen. Dem vollsynthetischen Perfusat wurde Glucose und Albumin hinzugefügt. Über den Nutzen eines Zusatzes von Albumin bestehen in der Literatur unterschiedliche Ansichten (Hetzl et al, 1973; Schmucker et al., 1975; Sies, 1978; Sugano et al., 1978; Meijer et al, 1981). Hier schien die Zugabe von Albumin aufgrund der hohen Lipophilie von Tergurid in der Funktion eines Carriers durchaus indiziert.

Nach 1,5 h Perfusion enthielt das Perfusat 57 % der eingesetzten Radioaktivität, die Leber 31 % und die Galle 8 %. Im Gegensatz dazu waren bei einer Studie mit LSD (Siddik et al., 1979a) nach einer Perfusionsdauer von 4,5 h nurmehr 20 % der eingesetzten Radioaktivität im Perfusat. Der gegenüber der vorliegenden Arbeit um den Faktor 2,5 erhöhte Gehalt an Radioaktivität läßt sich aus der kürzeren Perfusionsdauer (1,5 h gegenüber 4,5 h) und der höheren Dosierung (ca. 1,7 mg/g Leber gegenüber 1 mg/g Leber) erklären. Eine Perfusion ohne Sauerstoffträger - Siddik et al. (1979a) verwendeten ein semisynthetisches Medium mit humanen Erythrozyten - kann aus Gründen der Sauerstoffversorgung nur über kürzere Zeiträume hinweg durchgeführt werden (Sugano et al., 1978). So berichteten Toda und Oshino (1981) bei ihren Untersuchungen an Lisurid mit einem vollsynthetischen Medium über eine Perfusionsdauer von ebenfalls nur 2 h.

Das einzige Ziel der hier durchgeführten Perfusionen war es, eine möglichst große Ausbeute an Stoffwechselprodukten zu erhalten. Hierzu wurde nicht der Weg einer langen Perfusion mit der Gefahr von Hypoxie und Infektionen beschritten, sondern der einer Wiederholung von relativ kurzen Experimenten bei einem Substratüberangebot gewählt.

Daß die Enzymsysteme der Leber, die für die Biotransformation von Tergurid verantwortlich waren, durch das sehr hohe Substratangebot gesättigt waren, zeigt der nach 1,5 h relativ hohe Anteil - 29 % - von unverändertem Wirkstoff an der insgesamt eluierten Radioaktivität im Perfusat. Toda und Oshino (1981) berichteten über nur 1 % unverändertes Lisurid nach 2 h Perfusion bei einer Dosierung von 0.1 mg/g Leber.

Der am Ende der Perfusionen relativ hohe Dosisanteil von Tergurid in der Leber (ca. 4 % d. Dosis/g) zeigt eine etwa 10-fach höhere Anreicherung der Radioaktivität in diesem

Gewebe gegenüber dem Perfusat (ca. 0.4 % d. Dosis/ml) an. Vermutlich besteht der in der Leber vorhandene Dosisanteil ganz überwiegend aus unverändertem Wirkstoff, da die wasserlöslicheren Biotransformationsprodukte in das Perfusat übertreten konnten, während das lipophile Substrat in der Zelle kumulierte. Die Elimination von Metaboliten in die Galle war mit 8 % d. Dosis relativ gering und bot daher keine geeignete Grundlage für eine Metabolitenisolierung.

M I aus MZ A vertrat mit 14 % der insgesamt eluierten Radioaktivität den größten Anteil im Perfusatzgemisch. MZ B machte mit den in ihr enthaltenen Metaboliten M II - M IV 17.2 % aus. MZ C und D waren mit weniger als 10 % gleich stark vertreten.

Die nicht identifizierten Metaboliten aus MZ X repräsentierten immerhin 18 % der insgesamt eluierten Radioaktivität. Eine Isolierung von Verbindungen aus dieser Zone erschien aufgrund der Verteilung der Radioaktivität auf über die Hälfte der Fraktionen des Gesamtchromatogramms ohne deutlich erkennbare Peaks wenig aussichtsreich. 34 mg-Äquivalente ³H-Tergurid standen als Ausgangsmenge für die Metabolitenisolierung zur Verfügung. Diese auf den ersten Blick relativ hoch anmutende Menge war den Erfordernissen durchaus angemessen, da in den einzelnen Phasen der Isolierung methodische Verluste nicht zu vermeiden waren und für die Untersuchungen zur Strukturaufklärung wenigstens 0.1 mg sehr reiner Abbauprodukte bereitgestellt werden mußten.

2. Metabolitenisolierung

Die Metabolitenisolierung aus dem Perfusatzgemisch erfolgte mit Hilfe präparativer HPLC über HPLC-Säulen absteigenden Innendurchmessers (16 mm, 8 mm, 4.6 mm). Dieses Prinzip wurde von Hümpel et al. (1984) bei der Isolierung von Abbauprodukten

des Lisurid beschrieben. Bemerkenswert ist, daß die stärker lipophilen Metaboliten M III, M V, M VI und M VII bereits nach Phase II (HPLC-Säule mit 8 mm ID) eine für die spektroskopische Identifizierung ausreichende Reinheit aufwiesen. Dieses läßt sich mit der Wahl eines geeigneten Trennsystems und dem in diesem Polaritätsbereich günstigen Verhältnis von Metabolitenmenge und Verunreinigungen erklären.

3. Wege der Biotransformation von Tergurid

Für 7 isolierte Metaboliten konnten anhand der Daten aus ¹H-NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie Strukturvorschläge erbracht werden. Abbildung 21 zeigt ein auf den identifizierten Verbindungen beruhendes, denkbares Schema der Biotransformation von Tergurid im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber.

An dieser Stelle sollte noch einmal an den Modellcharakter der Studie erinnert werden. Eine vollständige Aufklärung aller Metaboliten war nicht das Ziel der Arbeiten, da zu erwarten war, daß die Anzahl der Stoffwechselprodukte zu hoch und deren relative Anteile im Metabolitenmuster zu unterschiedlich sein würden. Durch den Einsatz einer sehr hohen Dosis von Tergurid in der Leberperfusion war das Schwergewicht auf die Aufklärung von prinzipiellen Abbauwegen (Angriffspunkte im Molekül) gelegt worden.

Metabolit M V, N'-Desethyl-Tergurid, das Produkt einer oxidativen N-Desalkylierung am N-1 des Harnstoffrestes des Moleküls, darf als typisches Beispiel eines Weges der Biotransformation von Xenobiotica gelten. N-Desalkylierungen wurden u.a. bei der Metabolisierung von Ergotalkaloiden bereits von vielen Autoren beschrieben. Siddik et al. (1979a) berichteten bei einer Studie mit LSD am Modell der isoliert perfundierten

Rattenleber über das Auftreten von 6-Desmethyl-LSD und Desethyl-LSD. Letzteres wurde ebenfalls bei in vivo Versuchen an Ratte, Meerschweinchen und Rhesusaffe gefunden (1979b). Toda und Oshino (1981) untersuchten die Metabolisierung von Lisurid am gleichen Modell. N-Desalkylierungsreaktionen, die zur Bildung von Desmethyl-Lisurid, Desethyl-Lisurid, Didesethyl-Lisurid und Desmethyl-Desethyl-Lisurid führten, waren vorherrschend. Hümpel et al. (1984) isolierten aus dem Urin von Rhesusaffen Desethyl- und Didesethylverbindungen von Lisurid.

Obwohl Berde und Schild (1978) das N-6 als "metabolisch träge" charakterisierten, da N-Oxide oder Oxidationsprodukte am α -C-Atom nicht vorkämen, war das Auftreten von M V als einzigem N-Desalkylierungsprodukt von Tergurid im Hinblick auf bisher beschriebene Reaktionen von Ergotalkaloiden nicht zu erwarten. Die Tatsache, daß sekundäre Amine langsamer zu primären desalkyliert werden als tertiäre zu sekundären (Bonse u. Metzler, 1978), könnte das Fehlen von Didesethyl-Tergurid nach nur 1.5 h Perfusion erklären. Der entsprechende Metabolit von Lisurid wurde von Toda und Oshino (1981) in Perfusat und Galle nach einer Perfusionsdauer von 2 h und von Hümpel et al. (1984) im 12 h-Urin von Rhesusaffen nachgewiesen. Die Entstehung von N'-Didesethyl-Tergurid in vivo ist daher sehr wahrscheinlich. Es ist anzunehmen, daß sich diese Verbindung im polareren Teil des Metabolitenmusters verbarg.

Die Bildung von M VII, einem im C-Ring aromatisierten 2-oxo-Tergurid, belegt eine für Ergotalkaloide typische Oxidationsreaktion. Der hierzu analoge Metabolit des LSD wurde von Siddik et al. im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (1979a) und im Ganztierversuch (1979b) beschrieben. Auch Hümpel et al. fanden einen entsprechenden Metaboliten in ihrer Lisuridstudie (1984), der zusätzlich eine Hydroxylgruppe am C-9 aufwies (Oxidierung der bei Lisurid im Gegensatz zu Tergurid vorhandenen 9,10-Doppelbindung).

Auf chemischem Wege wurde ein analoger Metabolit einer Dihydro-lysergsäureverbindung bereits 1959 von Troxler und Hofmann synthetisiert. Dihydrolysergsäuremethylester (DHLSME) wurde mit Calciumhypochloritlösung zu 2-oxo-3-hydroxy-DHLSME oxidiert. Eine Toluollösung dieses Produkts wurde mit Benzolsulfonsäure erhitzt und führte unter Wasserabspaltung zur Bildung eines sogenannten Naphthostyrliderivates (im C-Ring aromatisiertes 2-oxo-DHLSME, s. Abb. 22).

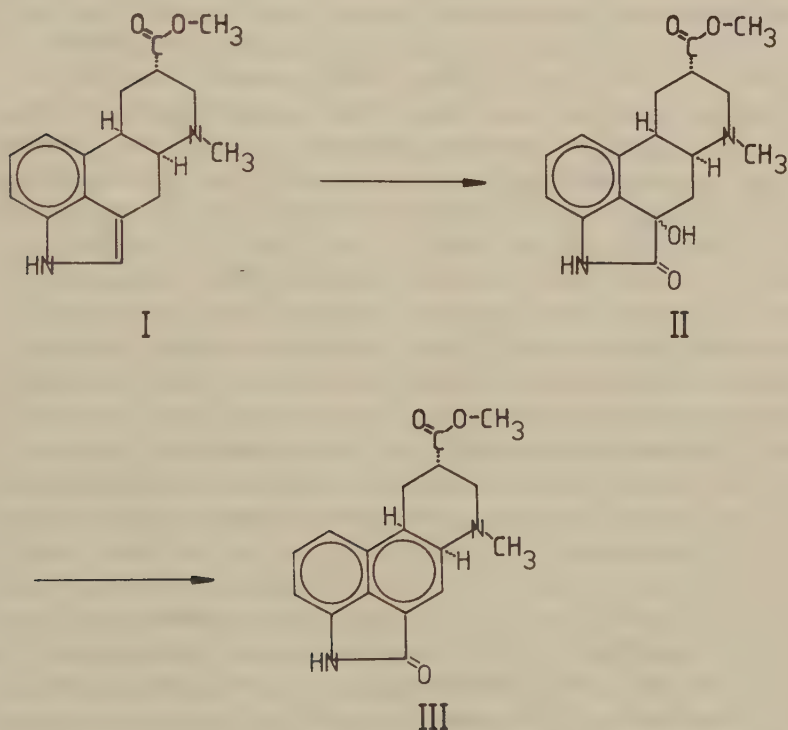


Abb. 22: Reaktion von DHLSME (I) zu 2-oxo-3-hydroxy-DHLSME (II) und dem Naphthostyrliderivat (III).

Da diese Reaktion chemisch möglich ist, ist auch die enzymatische Umsetzung der beiden stereoisomeren 2-oxo-3-hydroxy-Metaboliten von Tergurid, M II und M III, zum Naphthostyryl-derivat M VII wahrscheinlich (Dehydratisierung mit nachfolgender Dehydrierung).

Ein dem M VI, dem Terguridderivat mit geöffnetem Pyrrolring, analoger Metabolit wurde in der erfaßten Literatur zur Biotransformation von Ergotalkaloiden nicht beschrieben. Siddik et al. (1979b) vermuteten zwar im Urin von Rhesusaffen als Hauptmetaboliten von LSD eine Verbindung mit geöffnetem B-Ring, ein Strukturvorschlag wurde jedoch nicht erbracht. Maurer und Frick (1984) wiesen dagegen spektroskopisch gesicherte Strukturen mit geöffnetem Pyrrolring als Metaboliten von DHE nach. Hier verblieb jedoch im Gegensatz zu M VI eine Aldehydgruppe am N-1 des Ringsystems. Durch Oxidation dieser funktionellen Gruppe zur Carboxylverbindung und anschließende Decarboxylierung wäre der Übergang zu einer dem M VI analogen Struktur denkbar. Bei der Biotransformation von Bromocryptin wurde ein dem Pyrrol verwandter fünfgliedriger Ring, der Prolinring im Peptidanteil des Moleküls, oxidativ gespalten. Die Hydroxylierung am α -C-Atom des tertiären Amins zum Carbinolamin war Voraussetzung für die weiteren Reaktionen. Als daran sich anschließende Schritte wurden die Dehydrierung zum Lactam mit folgender Hydrolyse zum Glutaminsäurederivat bzw. zuerst die Ringöffnung zum Aminoaldehyd mit konsekutiver Oxidation gefordert.

Nur M II (3 β -Stellung), die zu M III stereoisomere 2-oxo-3-hydroxy-Verbindung von Tergurid, wurde auch von Hümpel et al. (1984) bei Lisurid nachgewiesen. Die Monooxygenierung war ein Hauptweg der Biotransformation bei Ratte und Primaten, wobei Kombinationen der 2-oxo-Gruppe mit einer Hydroxylgruppe am C-3 nur bei Primaten auftraten. Troxler und Hofmann (1959) beschrieben die Synthese von Dioxindolderivaten des LSD durch Calciumhypochlorit, wobei angenommen wurde, daß

die α -Stellung der Hydroxylgruppe am C-3 energetisch begünstigt sei. In dieser Publikation wurde auch die weitere Oxidation zu Naphthostyrylderivaten beschrieben, so daß - wie bereits erwähnt - dieser Reaktionsweg auch für die metabolische Umwandlung von M II bzw. M III zu M VII wahrscheinlich ist.

Bei der Entstehung von M II und M III ist der Weg über eine Epoxidbildung an der 2,3-Doppelbindung mit anschließender Hydrolyse und Diolbildung am C-2 und C-3 denkbar. 2-oxo-Verbindungen entstünden dann durch weitere Oxidation (Dehydrierung) der Hydroxylgruppe am C-2.

Das Auftreten von Stereoisomeren ist nicht ungewöhnlich, wenngleich aufgrund von Stereoselektivitäten der Enzymsysteme meist eine Form bevorzugt gebildet wird. In diesem Fall lag die 3 α -Hydroxy-Form in größerem Ausmaß vor als die 3 β -Hydroxy-Form.

M I und M IV sind Verbindungen, über die in der Literatur bisher nur wenig berichtet wurde. Zwar sind Strukturen dieser Art bekannt, jedoch waren keine Publikationen vorhanden, in denen sie als stabile (!) Metaboliten beschrieben würden. Saito et al. (1979) verfolgten die Bildung eines 1,2-Dioxetans, einem zyklischen Peroxid mit viergliedrigem Ring, aus einem Indolderivat. Das Endoperoxid war an C-2 und C-3 lokalisiert und fungierte als Zwischenprodukt für die Öffnung des Pyrrolrings. Diese Verbindung hatte bei -20°C eine lösemittelabhängige Halbwertszeit von z.B. 2700 s in CFCl_3 . Derart kurzlebige, thermolabile Endoperoxide sind auch aus den Gebieten der Photo- und Biolumineszenz bekannt (Adam, 1973). Sie zerfallen unter Lichtemission und dienen so als Energieträger bei diesem Phänomen. Einer der denkbaren Synthesewege würde über eine α -Hydroperoxycarbonsäure laufen, die unter Wasserabspaltung zum α -Peroxylacton zyklisierte (s. Abb. 23).



Abb. 23: Reaktion von einer α -Hydroperoxycarbonsäure (I) zu einem α -Peroxylacton (II)

Ein ähnlicher Reaktionsweg wäre auch für den Übergang von M I zu M IV vorstellbar.

Weiterhin unklar bleibt jedoch die hohe Stabilität dieser Verbindungen in der vorliegenden Arbeit. Dieser Frage sollte mit dem Versuch einer Synthese von Referenzsubstanzen nachgegangen werden.

Die Prostaglandinsynthese kann als Beispiel für das Vorkommen entsprechender Peroxide im Organismus herangezogen werden. Sie verläuft über Hydro- und Endoperoxide. Die Cyclooxygenase, als Dioxygenase Bestandteil der Prostaglandinsynthese, katalysiert die Bildung eines Endoperoxids aus Arachidonsäure (Jungermann u. Möhler, 1980). Die Aufspaltung des Endoperoxids resultiert in der Bildung von PGE_2 (s. Abb. 24). Ein analoger Weg wäre bei der Bildung von M II und M III aus M IV denkbar. Die O_2H -Gruppe am C-15 des Prostaglandinendoperoxids wird im weiteren Verlauf zur Hydroxylgruppe reduziert. Dieser Abbauweg könnte auch für M I postuliert werden.

Die Existenz eines Hydro- (M I) und Endoperoxidderivates (M IV) von Tergurid ist bis zur Synthese entsprechender Referenzsubstanzen als nicht gesichert zu werten.

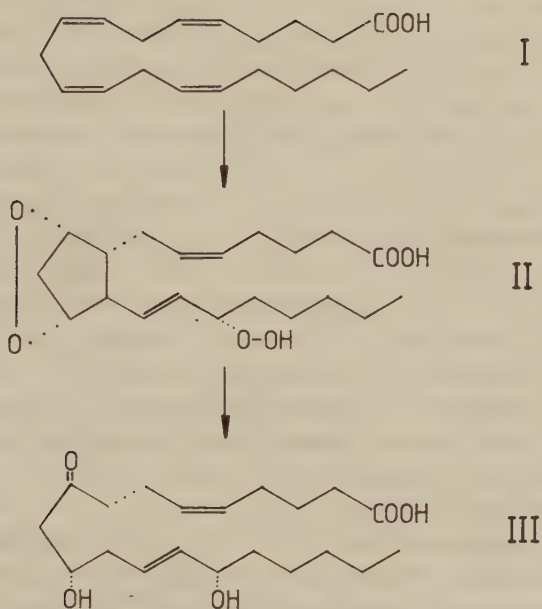


Abb. 24: Reaktion von Arachidonsäure (I) zu einem Endoperoxid (II) und zu PGE₂ (III)

Zudem muß die Möglichkeit einer artifiziellen Bildung von M IV in Betracht gezogen werden, da dieser Metabolit in drei zur spektroskopischen Aufklärung abgegebenen Proben, die aus unterschiedlichen Metabolitenbereichen (s. Abb. 9) stammten, identifiziert wurde.

Insgesamt lassen sich die Metabolisierungswege von Tergurid wie folgt beschreiben (s. Abb. 21):

1. Durch Monooxygenierung und über nicht erfaßte Zwischenstufen (Epoxid, Diol) werden die Metaboliten M II und M III (2-Keto-3 α -hydroxy; 2-Keto-3 β -hydroxy) gebildet. Hieraus könnte durch Wasserabspaltung und Dehydrierung der Metabolit M VII entstanden sein.

2. Die Monooxygenierung kann nicht nur zum 2,3-Epoxid, sondern eventuell durch Umlagerung oder auch direkt zum 2-Keto-Derivat des Tergurids führen. Hieraus dürfte durch oxidative Abspaltung des Formylrestes (formal: Hydrolyse) der Metabolit M VI entstanden sein.
3. Die Existenz von M V belegt die N'-Desalkylierung als weiteren Abbauweg von Tergurid.
4. Formal läßt sich durch Peroxidation des nicht erfaßten (aber postulierten) 2,3-Epoxids von Tergurid der Metabolit M IV erklären, dessen Hydrogenierung dann zu Metabolit M I führen würde. Die Strukturen beider Metaboliten bedürfen aber weiterer Bestätigung. Zudem bestehen Hinweise auf eine artefaktische Bildung von M I und M IV.
5. Es ist zu erwarten, daß die Umsetzungen an der metabolisch labilsten Stelle des Moleküls (Δ 2/3-Doppelbindung) auch vom N'-Monodesethyltergurid und vom N'-Didesethyltergurid ausgehen können. Dadurch würde sich die Zahl der Metaboliten um den Faktor 3 erhöhen.
6. Drei weitere Umsetzungswege, die von der Stoffklasse der Ergoline her bekannt sind, konnten aus dem vorhandenen Material nicht dokumentiert werden. Dies schließt jedoch derartige Umsetzungen in anders konzipierten in vitro Untersuchungen oder in in vivo Studien nicht aus:
 - Hydroxylierung des A-Ringes
 - N₆-Desmethylierung
 - N₆-Oxidbildung

Die hohe Anzahl der in vivo gefundenen Metaboliten weist darauf hin, daß diese Metabolisierungswege zumindest teilweise noch parallel zu den anderen Stoffwechselwegen verlaufen könnten.

4. Studien am Ganztier

4.1 Pharmakokinetische Betrachtungen

Die vorliegenden Ergebnisse der in vivo Studien erlauben keine ausführliche Diskussion der Pharmakokinetik von Tergurid bei den verschiedenen Tierarten, da die Versuche lediglich unter dem Aspekt der vergleichenden Biotransformation durchgeführt wurden (geringe Anzahl von Proben). Gleichwohl lassen sich aus den Ausscheidungsdaten die folgenden Schlüsse ziehen:

1. Tergurid wird nach intragastraler Gabe vollständig oder nahezu vollständig resorbiert.
2. Das Ausmaß der renalen Ausscheidung von Tergurid und seinen Metaboliten ist abhängig von der untersuchten Tierart und steigt in der Reihe Ratte - Hund - Affe an.
3. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nach i.v. oder i.g. Gabe befanden sich mehr als 10 % d. Dosis im gesamten Plasmavolumen.

Das Ausmaß der Resorption von Ergotalkaloiden ist nicht immer vollständig. So werden z.B. Ergotamin und dessen Abkömmlinge beim Menschen nur zu etwa 30 % d. Dosis resorbiert (Kanto, 1983). Ergoline, die - anders als Ergotamin - keinen Peptidrest besitzen, werden hingegen wesentlich besser resorbiert (Lisurid, Hümpel et al., 1981). In den vorliegenden Studien wurde eine relativ niedrige Dosis Tergurid als Lösung gegeben, um eine möglichst vollständige Resorption der i.g. applizierten Dosis zu erreichen. Der Vergleich der nach i.v. und i.g. Gabe renal eliminierten Dosisanteile zeigte, daß dieses Ziel erreicht werden konnte.

Tierartliche Unterschiede im Ausmaß der renalen Elimination von Xenobiotika sind allgemein bekannt. Die bei der Ratte häufig geringe Ausscheidung von Substanzen über die Niere hängt vermutlich mit einer Art "Molekulargewichtsschranke" in der Leber zusammen.

Diese "Schranke" filtert Substanzen mit höherem Molekulargewicht als ca. 300 (Siddik et al., 1979b) für die hepatäre Elimination heraus. Insofern sind die beobachteten tierartlichen Unterschiede in der Elimination von Tergurid und seinen Metaboliten nicht als ein Spezifikum für die Substanz anzusehen, sondern reflektieren eine allgemeine Speziesdifferenz.

Ebenfalls nicht als eine substanzspezifische Beobachtung ist zu werten, daß der überwiegende Anteil der verabreichten Terguriddosis sich zu jedem Zeitpunkt in Organen und Geweben aufhält.

Arzneimittel sind meist stark lipophile Verbindungen mit einer sehr guten Membrangängigkeit. Dies ist oftmals eine Voraussetzung für ihre Wirkung in der Zelle. Bei Substanzen, deren Wirkort im Gehirn liegt, ist dies unabdingbar (Passage der Blut-Hirn-Schranke).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß aus den wenigen Ergebnissen der Pharmakokinetik von Tergurid im Tierartenvergleich keine substanzspezifische Information zu ziehen ist.

4.2 Biotransformation

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich einige allgemeine Aussagen zur Biotransformation von Tergurid treffen:

1. Bei keiner Tierart ließen sich qualitative Unterschiede im Metabolitenmuster nach intravenöser und intragastraler Gabe erkennen.
2. Die Elimination von Tergurid erfolgte bei allen Tierarten nahezu ausschließlich in Form von Metaboliten.
3. Es bestehen ausgeprägte quantitative tierartliche Unterschiede im Metabolitenmuster von Tergurid.

Ad. 1: Qualitative Unterschiede im Metabolitenmuster einer Substanz nach intravenöser und intragastraler Gabe können vorkommen, wenn Metabolisierungsschritte nach i.v. Gabe bereits in der Lunge oder anderweitig extrahepatär ablaufen und zudem die i.g. verabreichte Dosis einer hohen hepatischen Extraktion unterliegt. Weiterhin können qualitative Unterschiede durch einen Beitrag der Magen- und Intestinalwand zur Biotransformation entstehen. Das hohe Maß an Übereinstimmung der Metabolitenmuster nach i.v. und i.g. Gabe bei den hier untersuchten Tierarten zeigt, daß die oben angeführten Einflüsse auf die Biotransformation im Fall von Tergurid bei keiner Tierart maßgeblich sind. Es kann also mit einiger Sicherheit angenommen werden, daß die Leber das einzige Metabolisierungsorgan für Tergurid darstellt. Damit ergibt sich nachträglich eine Bestätigung für die Richtigkeit der Wahl der isoliert perfundierten Rattenleber als Modell der Biotransformation.

Ad 2: Wenngleich das Ausmaß der hepatischen Elimination von unveränderter Wirksubstanz bei keiner Tierart überprüft wurde, kann aufgrund der sehr geringen renalen Ausscheidung von unverändertem Tergurid und des stark sinkenden Verhältnisses von unverändertem Wirkstoff und seinen Metaboliten im Plasma geschlossen werden, daß Tergurid den Organismus in unveränderter Form nicht verläßt. Tergurid muß demnach in wasserlöslichere Formen umgewandelt werden, um ausscheidungsfähig zu werden, was allgemein für lipophile Arzneistoffe gilt. Auffällig ist jedoch die außerordentlich hohe Anzahl von polaren Abbauprodukten, was für eine metabolisch relativ instabile Verbindung spricht.

Ad 3: In qualitativer Hinsicht unterscheiden sich die Metabolitenmuster sowohl im Plasma als auch im Urin der verschiedenen Spezies nur wenig. Die Metabolitenzonen A bis D, die die strukturell aufgeklärten Abbauprodukte beinhalteten, waren bei allen Tierarten - wenn auch unterschiedlich stark - vertreten. Metabolitenzone X wurde unter qualitativem Aspekt nicht untersucht, da dies zum einen nicht Aufgabenstellung dieser Studie war und zum anderen die große Anzahl an Biotransformationsprodukten dieses Unterfangen unmöglich gemacht hätte.

Quantitativ zeigten sich Unterschiede in der Art des Hauptmetaboliten: während bei der Ratte N_6 -Monodesethyl-Tergurid (M V) am stärksten vertreten war, stellte bei Hund und Affe die das Hydroperoxidderivat von Tergurid (M I) enthaltende Zone den Hauptanteil der Radioaktivität. Beide Metaboliten bildeten bei den entsprechenden Spezies sowohl im Plasma als auch im Urin die stärkste Fraktion, was als Beweis ihrer guten Nierengängigkeit und als Hinweis auf ihre metabolische Stabilität gewertet wurde.

Der Anteil an nicht aufgeklärten Biotransformationsprodukten nahm im Zeitverlauf bei allen Spezies deutlich zu. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß verschiedenste Derivate von N_6 -Mono- und N_6 -Didesethyl-Tergurid erst mit fortschreitender Zeit entstehen.

Die große Anzahl von stark polaren Metaboliten beim Affen läßt auf sehr komplexe Wege der Biotransformation bei dieser Tierart schließen. Der

Hund nimmt im Hinblick auf die Zahl an entstandenen Verbindungen eine Übergangsstellung zur Ratte ein, bei der die wenigsten Metaboliten zu verzeichnen waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in quantitativer Hinsicht große Speziesunterschiede auffielen.

5. Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber im Vergleich zum Ganztiersversuch

Die in vivo Metabolisierung von Tergurid ließ sich am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber sehr gut nachvollziehen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Toda und Oshino (1981) bei ihren Studien mit Lisurid.

Ein Vergleich der Metabolitenmuster aus dem Perfusat und dem entsprechenden in vivo Substrat, dem Plasma der Ratte, erbrachte nur quantitative Unterschiede. Während im Perfusat N₆-Monodesethyl-Tergurid nur mit weniger als 10 % vertreten war, erreichte sein Anteil im Plasma über 40 %. Ein Vergleich beider Versuchsansätze - hohe Dosierung und nur eine Probenahme nach 90 min bei der Leberperfusion - kann diese Unterschiede jedoch durchaus verständlich werden lassen. Über 80 % der insgesamt eluierten Radioaktivität im Plasma und nahezu 50 % im Urin konnten bekannten Strukturen zugeordnet werden.

Eine derart hohe Aufklärungsrate im Plasma ist sehr positiv zu beurteilen, da diese Metaboliten bei der Entstehung von Nebenwirkungen eine wesentliche Rolle spielen. Ein Vergleich mit den Metabolitenmustern aus den Ganztiersversuchen an Hund und Affe zeigte immer noch verhältnismäßig hohe Ausbeuten an identifizierten Verbindungen. Beim Hund waren 3 h p.appl. zwischen 60 und 70 %, beim Affen noch 40 - 50 % der Radioaktivität im Plasma bekannten Strukturen zuzuordnen. Im Urin war diese Relation jedoch deutlich ungünstiger: 40 % beim Hund und nur 10 - 20 % beim Affen waren bekannter Natur.

Eine vollständige Übereinstimmung der Metabolitenmuster aus in vitro und in vivo Ansatz war bei der spezifischen Ausrichtung der Studie nicht zu erwarten. Der Schwerpunkt lag auf der Erfassung von prinzipiellen Abbauwegen, die im Zeitverlauf verhältnismäßig früh erkannt werden konnten.

6. Wert der Studie und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einblick in die prinzipiellen Stoffwechselwege von Tergurid gewonnen werden. Die dokumentierten Biotransformationsschritte verliefen in zahlreicher Hinsicht parallel zur Biotransformation von verwandten Ergotalkaloiden (Lisurid, Hümpel et al., 1984), so daß zusätzliche Analogiewege sehr wahrscheinlich sind. Aus solchen Reaktionen hervorgegangene Abbauprodukte verbargen sich vermutlich im polarereren Teil der Metabolitenmuster. Die Isolierung und Identifizierung von Metaboliten aus dem wirkstoffnahen Bereich der Chromatogramme, in dem relativ wenige, dafür aber mengenmäßig wichtige Biotransformationsprodukte enthalten waren, erscheint so zurückblickend zur Aufklärung prinzipieller Stoffwechselwege von Tergurid sehr günstig.

Die Studie lieferte weiterhin Ansatzpunkte für die Synthese neuer Strukturen. Tergurid wird wie Lisurid nahezu vollständig metabolisiert und weist damit eine äußerst geringe Bioverfügbarkeit auf. Die Hydrierung der 9,10-Doppelbindung scheint also wenig Einfluß auf die metabolische Stabilität dieser Verbindung zu haben.

Hauptangriffspunkt der Biotransformation war der Indolring, so daß künftige Bestrebungen bei der Synthese neuer Wirkstoffe dahin gehen sollten, dieses System zu stabilisieren (z.B. durch Substitution am C-2).

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber ist letztendlich sehr gut zur Einsparung von Tierversuchen geeignet.

Die hohe Neurotoxizität des Wirkstoffs hätte bei entsprechend niedriger Dosierung und gleichem Gesamteinsatz an Tergurid die über 100-fache Menge an Tieren erforderlich gemacht.

VI ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biotransformation von Tergurid, einem synthetischen Ergotalkaloidderivat, am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht und die Tauglichkeit dieses Modells im Hinblick auf eine Einsparung von Tierversuchen beurteilt.

Aus einem Perfusatgemisch wurden mittels präparativer HPLC verschiedene Abbauprodukte isoliert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden (Massenspektrometrie, ^1H -NMR-Spektroskopie) identifiziert. Für folgende Metaboliten konnten Strukturvorschläge erbracht werden:

- ein Hydroperoxidderivat von Tergurid (M I)
- 2-oxo-3-hydroxy-Tergurid (3 β - M II, 3 α - M III)
- ein Endoperoxidderivat von Tergurid (M IV)
- N'-desethyl-Tergurid (M V)
- ein Terguridderivat mit geöffnetem Pyrrolring (M VI)
- ein Naphthostyrylderivat von Tergurid (M VII).

Anhand der erhaltenen Verbindungen und von postulierten Analogieprodukten wurden Wege der Biotransformation von Tergurid diskutiert.

Die bekannten Substanzen wurden Metabolitenmustern aus Ganztierversuchen an Ratte, Hund und Affe (*Macaca fascicularis*) zugeordnet.

Tergurid wurde bei allen untersuchten Spezies nahezu vollständig metabolisiert. Die beste Übereinstimmung ergab sich im Vergleich zwischen isoliert perfundierter Rattenleber und dem Ganztier Ratte.

Aufgrund der guten Übertragbarkeit der in vitro Verhältnisse auf in vivo Bedingungen wurde geschlossen, daß mit Hilfe des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber Tierversuche beim Studium des Fremdstoffmetabolismus eingespart werden können.

SUMMARY

EXPERIMENTS ON THE BIOTRANSFORMATION OF TERGURIDE: A COMPARISON BETWEEN THE MODEL OF ISOLATED RAT LIVER PERFUSION AND IN VIVO TESTS ON RATS, DOGS AND MONKEYS

In the present work the biotransformation of terguride, a synthetic ergot derivate, was examined in the model of isolated rat liver perfusion. Furthermore this model was studied on its ability to reduce animal experiments.

Several decomposition products were isolated out of a mixture of perfusion fluids by means of preparative HPLC, these then being identified with spectroscopic methods (mass spectrometry, ^1H -NMR-spectroscopy). Structures were proposed for the following metabolites:

- a hydroperoxide derivate of terguride (M I)
- 2-oxo-3-hydroxy-terguride (3 β - M II, 3 α - M III)
- an endoperoxide derivate of terguride (M IV)
- N'-deethyl-terguride (M V)
- a derivate of terguride with opened pyrrole ring (M VI)
- a naphthostyryl derivate of terguride (M VII)

The metabolic pathway of terguride was discussed on the base of the known structures and postulated analogue products.

The identified compounds were assigned to metabolite patterns of in vivo tests with rats, dogs and monkeys (*macaca fascicularis*).

Terguride was almost totally metabolized in all examined species. The highest degree of similarity was achieved in the comparison of metabolite patterns of isolated rat liver perfusion and the whole animal rat.

Because of the good transferability of in vitro conditions to the rat in vivo it was concluded that the model of isolated rat liver perfusion is a useful tool to reduce animal experiments in studies on biotransformation of xenobiotics.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM W.:
Biologisches Licht
Chemie in unserer Zeit 7, 182 - 191, (1973)
- AXELROD J. BRADY, R.O., WITKOP E., EVARTS E.V.:
Metabolism of lysergic acid diethylamide
Nature (Lond.) 178, 143 - 144 (1956)
- BAHR C.v., ALEXANDERSON B., AZARNOFF D.L., SJÖQVIST F., ORRE-
NIUS S.:
A comparative study of drug metabolism in the isolated
perfused liver and in vivo in rats
Eur. J. Pharmacol. 9, 99 - 105 (1970)
- BARTHEL W.:
Venotonisierender Effekt, Pharmakokinetik und unerwünschte
Wirkungen von Dihydroergotamin
Z. ges. inn. Med. 39, 417 - 428 (1984)
- BERDE B., SCHILD H.O. (eds.):
Ergot alkaloids and related compounds
Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1978)
- BERENBOM M., YOUNG L.:
Biochemical studies of toxic agents
Biochem. J. 49, 165 - 169 (1951)
- BERNARD C.:
Sur le mechanisme de la formation du sucre dans la foie
C.R. Acad. Sci 41, 461 - 463 (1855)
- BICKEL M.H., MINDER R.:
Metabolism and biliary excretion of the lipophilic drug
molecules, imipramine and desmethylinipramine in the
rat - I; experiments in vivo and with isolated perfused
livers
Biochem. Pharmacol. 19, 2425 - 2435 (1970)
- BIRKMAYER W., HORNYKIEWICZ O.:
Der L-3,4-Dioxyphenylalanin (= Dopa) Effekt bei der
Parkinson-Akinese
Wien. Klin. Wochensh. 73, 787 - 788 (1961)
- BONSE G., METZLER M.:
Biotransformation organischer Fremdstoffen
Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1978)
- BREDBERG U., EYJOLFSDOTTIR G.S., PAALZOW L., TFELT-HANSEN P.,
TFELT-HANSEN V.:
Pharmacokinetics of methysergide and its metabolite
methylergometrine in man
Eur. J. Clin. Pharmacol. 30, 75 - 77 (1986)

- CARRUBA M.O., RICCIARDI S., NEGREANU J., CALOGERO M., MANTE-
GAZZA P.:
Effects of lisuride on body temperature of rats and
rabbits: relation to microsomal biotransformation and
dopaminergic receptor stimulation
Psychopharmacology 70, 223 - 229 (1980)
- CORSINI G.U., HOROWSKI R., RAINER E., DEL ZOMPO M.:
Treatment of Parkinson's disease with a dopamine partial
agonist
Clin. Neuropharm 7 Suppl. 1, 950 - 951 (1984)
- DALLABONZANA D., LUIZZI A., OPPIZZII G., VERDE G., CHIODINI
P.G., DOROW R., HOROWSKI R.:
Effect of the new ergot derivate terguride on plasma
PRL and GH levels in patients with pathological hyper-
prolactinemia or acromegaly
J. Endocrinol. Invest. 8, 147 - 151 (1985)
- DEL POZO E., BRUN DEL RE R., VARGA L., FRIESEN H.:
The inhibition of PRL secretion in man by CB 154 (2-
bromo-alpha-ergocryptine)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 768 - 770 (1972)
- DITTMER D.S. (ed.):
Blood and other body fluids
Washington: Fed. of Am. Soc. for Exp. Biology (1961)
- EADIE M.J.:
Ergotamine pharmacokinetics in man: an editorial
Cephalalgia 3, 135 - 138 (1983)
- FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W. (eds.):
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich: B.I.-
Wissenschaftsverlag (1980)
- GARATTINI S., GUAITANI A., BARTOSEK J.:
Use of isolated perfused liver in the study of drug
metabolism
In: Bartosek J., Guaitani A., Miller L.L. (eds.)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 225 - 234 (1973)
- GUDER W., FRÖHLICH J., WIELAND O.:
Determination of the functional state of lysosomal en-
zymes in perfused rat liver and the effect of glucagon
In: Bartosek J., Guaitani A., Miller L.L. (eds.)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 109 - 116 (1973)

HETZEL W.D., RHEINGANS K., STAIB W.:

Cortisol metabolism in isolated perfused livers of rats and guinea pigs with and without albumin
In: Bartosek J., Gwaitani A., Miller L.L. (eds.)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 251 - 258 (1973)

HOROWSKI R.:

Neue Mutterkornpräparate bei der Behandlung der Hyperprolaktinämie und Migräne
Wz Schering AG, Berlin (1985) (unveröffentlicht)

HÜMPEL M., TODA T., OSHINO N., POMMERENKE G.:

The pharmacokinetics of lisuride hydrogenmaleate in rat, rabbit and rhesus monkey
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 6, 207 - 219 (1981)

HÜMPEL M., KRAUSE W., HOYER G.A., WENDT H., POMMERENKE G.:

The pharmacokinetics and biotransformation of ¹⁴C-lisuride hydrogenmaleate in rhesus monkey and in man
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 9, 347 - 357 (1984)

INOUE T., NIWAGUCHI T., MURATA T.:

Enzymic formation of dehydrogenated and hydroxylated metabolites from lysergic acid diethylamide by rat liver microsomes
Xenobiotica 10, 343 - 348 (1980a)

INOUE T., NIWAGUCHI T., MURATA T.:

Effects of inducers and/or inhibitors on metabolism of lysergic acid diethylamide in rat liver microsomes
Xenobiotica 10, 913 - 920 (1980b)

ISHII H., NIWAGUCHI F., NAKAHARA Y., HAYASHI M.:

Studies on lysergic acid diethylamide and related compounds. Part 8. Structural identification of new metabolites of LSD obtained by microbial transformation using *Streptomyces roseochromogenes*
J. Chem. Soc. Perkin I, 902 - 905 (1980)

JUNGERMANN K., MÖHLER H.:

Biochemie - Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie
Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag (1980)

KANTO J.:

Clinical pharmacokinetics of ergotamine, dehydroergotamine, ergotoxine, bromocriptine, methysergide and lergotrile
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Tox. 21, 135 - 142 (1983)

KELLER H.H., DA PRADA M.:

Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotrile and bromocriptine
Life Sciences 24, 1211 - 1222 (1979)

KESTENS P.J., LAMBOTTE L.:

Surgical preparation of the liver for perfusion
In: Bartosek J., Guitani A., Miller L.L. (eds)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 53 - 62 (1973)

KITCHIN K.T.:

An enzymatic approach to biotransformation
Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 6, 303 - 310 (1984)

KRAUSE W., DOROW R., NIEUWEBOER B., HASAN S.H.:

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ergot derivative, transdihydroergolide, in man
Eur. J. Clin. Pharmacol. 27, 335 - 339 (1984)

MARTINI A., MORO E., MARRARI P., PACCIARINI M.A., SEGA R., DELL'OSSO L., BERTELLI A. Jr., TAMASSIA V.:

Pharmacokinetics and bioavailability of metergoline in healthy volunteers after single i.v. and oral administration
Int. J. Clin. Pharm. Res. 3, 27 - 34 (1983)

MAURER G., SCHREIER E., DELABORDE S., LOOSLI H.R., NUFER R., SHUKLA A.P.:

Fate and disposition of bromocriptine in animals and man.
I: Structure and elucidation of the metabolites
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 7, 281 - 292 (1982)

MAURER G., SCHREIER E., DELABORDE S., NUFER R., SHUKLA A.P.:

Fate and disposition of bromocriptine in animals and man.
II: Absorption, elimination and metabolism
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 8, 51 - 62 (1983)

MAURER G., FRICK W.:

Elucidation of the structure and receptor binding studies of the major primary, metabolite of dihydroergotamine in man
Eur. J. Clin. Pharmacol. 26, 463 - 470 (1984)

MEIJER D.K.F., KEULEMANS K., MULDER G.J.:

Isolated perfused rat liver technique
Meth. Enzymol. 77, 81 - 93 (1981)

MILLER L.L., BLY C.G., WATSON M.L., BALE W.F.:

The dominant role of the liver in plasma protein synthesis
J. Exp. Med. 94, 431 - 453 (1951)

MILLER L.L.:

Technique of isolated rat liver perfusion
In: Bartosek J., Guitani A., Miller U. (eds)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 11 - 52 (1973)

- MITZKAT H.J., MEYER U.:
Metabolic state of isolated perfused rat liver and model-induced metabolism modifications
In: Bartosek J., Guaitani A., Miller L.L. (eds)
Isolated liver perfusion and its applications
New York: Raven Press, 79 - 86 (1973)
- MÜLLER-SCHWEINITZER E., TAPPARELLI C.:
Methylergometrine, and active metabolite of methysergide
Cephalalgia 6, 35 - 41 (1986)
- NIWAGUCHI T., INOUE T., NAKAHARA Y.:
Studies on enzymatic dealkylation of D-lysergic acid diethylamide (LSD)
Biochem. Pharmacol. 23, 1073 - 1078 (1974)
- OSHINO N., CHANCE B.:
Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase
Biochem. J. 162, 509 - 525 (1977)
- PFEFFER M.W.:
Anaerobe Biotransformation von Acarbose durch intestinale Mikroflora - Entwicklung eines generell anwendbaren Prüfungssystems
Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Würzburg (1986)
- SAITO J., MATSUGO S., MATSUURA T.:
1,2-dioxetane formation in an idole system
J. Am. Chem. Soc. 101, 4757 - 4759 (1979)
- SCHIMASSEK H.:
Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetic medium and control of liver function
Life Sci. 11, 629 - 634 (1962)
- SCHIMASSEK H.:
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber
Biochem. Z. 336, 460 - 467 (1963)
- SCHMUCKER D.L., JONES A.L., MICHELSEN C.E.:
An improved system for hemoglobin-free perfusion of isolated rat livers
Lab. Invest. 33, 168 - 175 (1975)

SIDDIK Z.H., BARNES R.D., DRING L.G., SMITH R.L., WILLIAMS R.T.:
The fate of lysergic acid di (^{14}C)ethylamide ((^{14}C)LSD) in the rat
Biochem. Soc. Trans. 3, 290 - 292 (1975)

SIDDIK Z.H., BARNES R.D., DRING L.G., SMITH R.L., WILLIAMS R.T.:
The metabolism of lysergic acid di (^{14}C)ethylamide ((^{14}C)LSD) in the isolated perfused rat liver
Biochem. Pharmacol. 28, 3081 - 3091 (1979a)

SIDDIK Z.H., BARNES R.D., DRING L.G., SMITH R.L., WILLIAMS R.T.:
The fate of lysergic acid di (^{14}C)ethylamide ((^{14}C)LSD) in the rat, guinea pig and rhesus monkey and of (^{14}C)iso-LSD in rat
Biochem. Pharmacol. 28, 3093 - 3101 (1979b)

SIES H.:
The use of perfusion of liver and other organs for the study in microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems
Meth. Enzymol. 52, 48 - 59 (1978)

SUGANO T., SUDA K., SHIMADA M., OSHINO N.:
Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium
J. Biochem. 83, 995 - 1007 (1978)

TESTA B., JENNER P.:
Drug metabolism: chemical and biochemical aspects
New York, Basel: Marcel Dekker Inc. (1976)

THURMAN R.G., REINKE L.A., KAUFFMAN F.C.:
The isolated perfused liver: a model to define biochemical mechanisms of chemical toxicity
In: Hodgson E., Bend J.R., Philpot R.M. (eds)
Reviews in biochemical toxicology
New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier/North-Holland, 249 - 285 (1979)

TODA T., OSHINO N.:
Biotransformation of lisuride in the hemoglobin-free perfused rat liver and in the whole animal
Drug Metab. Dispos. 9, 108 - 113 (1981)

TROWELL O.A.:
Urea formation in the isolated perfused liver of the rat
J. Physiol. 100, 432 - 435 (1942)

TROXLER F., HOFMANN A.:

Oxidation von Lysergsäure-Derivaten in 2,3-Stellung
Helv. Chim. Acta 42, 793 - 802 (1959)

VICARIO G.P., BATTAGLIA R., BERNARDI L., ARCAMONE F.:

Metabolism of metergoline in the rat
Il Farmaco-Ed. Sc. 37, 651 - 662 (1983)

WACHTEL, H.:

Central dopaminergic and antidopaminergic effects of
ergot derivatives structurally related to lisuride
In: Calne D.B., Horowski R., McDonald R.J., Wuttke W.
(eds)
Lisuride and other dopamine agonists
New York: Raven Press (1983)

WACHTEL H., DOROW R.:

Dula action on central dopamine function of transdihydro-
lisuride, a 9,10-dihydrogenated analogue of the ergot
dopamine agonist lisuride
Life Sci. 32, 421 - 432 (1983)

ZIKAN V., SEMONSKY M., REZABEK K., AUSKOVA M., SEDA M.:

Ergot alkaloids XL. Some N-(D-6-methyl-8-isoergolin-I-yl)-
and N-(D-6-methyl-8-isoergolin-II-yl)-N'-substituted
ureas
Coll. Czech. Chem. Commun. 37, 2600 - 2605 (1972)

Herrn Dr. M. Hümpel (Leiter des Hauptdepartments Pharmakokinetik der Schering AG, Berlin) gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Petter danke ich für die immer prompte und konstruktive Kritik bei der Anfertigung der Dissertation.

Herrn Dr. U. Täuber (Leiter des Departments Pharmakokinetik A) möchte ich ebenfalls für seine Hilfe bei diversen Teilabschnitten dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. W. Krause (Leiter des Departments Pharmakokinetik B) und Herrn Dr. G. Hoyer (Leiter des Departments Spektrometrie) gilt mein Dank für die Auswertung der spektroskopischen Untersuchungen.

Des weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Hauptdepartments Pharmakokinetik für ihre Hilfsbereitschaft bezüglich aller möglichen Fragestellungen bedanken, besonders bei Frau Hille Gieschen und Herrn Christian Weiß.

Mein Dank gilt auch Frau Sabine Freytag für die Mühe beim Schreiben der Dissertation.

L E B E N S L A U F

ZUR PERSON:

22.04.1960 geboren in München
Vater: Heinz Förster
Mutter: Elisabeth Förster
geb. Pfister

SCHULBILDUNG:

1966 - 1970 Besuch der Volksschule a.d.
Fürstenriederstr., München
1970 - 1977 Besuch des Erasmus-Grasser-
Gymasiums, München
1977 - 1979 Besuch des Ludwigsgymnasiums,
München
27.06.1979 Zeugnis der Allg. Hochschul-
reife

BERUFLICHE AUSBILDUNG:

1979 - 1985 Studium der Veterinärmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität, München
10.01.1985 Staatsexamen
22.02.1985 Approbation als Tierärztin
1985 - 1986 Dissertation bei der Schering
AG, Berlin

